

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biochimie et Physicochimie alimentaire

École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau

Unité de recherche UMR IATE - CIRAD

Valorisation des composés phénoliques de colza et de tournesol : du fractionnement des matières premières à la synthèse de molécules multifonctionnelles

Présentée par Oscar LAGUNA

Le 13 février 2019

Sous la direction de Jérôme LECOMTE

Devant le jury composé de

Catherine SARAZIN, Professeure, Université de Picardie, Amiens

Marie-Hélène ROPERS, Chargée de Recherche, INRA, Nantes

Frédérique CARRIERE, Directeur de Recherche, CNRS, Marseille

Romain KAPEL, Maître de Conférence, Université de Lorraine, Nancy

Valérie LULLIEN-PELLERIN, Directrice de Recherche, INRA, Montpellier

Jérôme LECOMTE, Chargé de Recherche, CIRAD, Montpellier

Jérôme LE NÔTRE, Directeur R&D SAS PIVERT, Compiègne

Rapporteure

Rapporteure

Examineur, Président du jury

Examineur

Examinatrice

Directeur de thèse

Invité



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Valorisation des composés phénoliques de colza et de tournesol : du fractionnement des matières premières à la synthèse de molécules multifonctionnelles

Résumé :

Les tourteaux de colza et de tournesol, principalement utilisés en alimentation animale pour leur forte teneur en protéines, représentent des sources d'acides phénoliques aux propriétés antioxydantes et bioactives variées mais peu valorisées à ce jour. Par ailleurs, les procédés de séparation de ces composés sont basés sur des extractions par solvants qui génèrent des effluents et impactent l'intégrité des autres composants des matières premières.

La première partie de ce travail de thèse a été consacrée au développement de nouveaux procédés de séparation de la fraction phénolique des tourteaux de colza et de tournesol. Après un broyage adéquat des tourteaux, le fractionnement par tri électrostatique et turbo-séparation a permis d'obtenir des fractions enrichies en protéines et composés phénoliques. Dans les deux cas, l'état granulométrique des tourteaux broyés a été déterminant. Le tri électrostatique a conduit aux plus forts taux d'enrichissement en protéines et composés phénoliques (jusqu'à deux fois la concentration dans les tourteaux) avec des rendements de l'ordre de 30% après recyclages. Cette étape a été suivie par l'extraction de la fraction phénolique par des mélanges hydro-alcooliques « verts » à base d'éthanol, en substitution au méthanol.

Dans la deuxième partie, nous nous sommes intéressés à la production enzymatique des acides sinapique et caféique, à partir des tourteaux ou de leurs extraits. Trois cinnamoyl estérases recombinantes d'*A. niger* aux activités et spécificités différentes ont été testées. L'hydrolyse des tourteaux non traités thermiquement s'est traduite par une dégradation des composés phénoliques par des enzymes endogènes. Le problème a pu être contourné en réalisant l'hydrolyse sur l'extrait phénolique des tourteaux avec néanmoins, dans le cas du colza, l'existence de réactions secondaires néfastes au rendement en acide sinapique.

La dernière partie a consisté en la synthèse de mono- et di-esters d'acide sinapique et caféique avec différents α,ω -diols aliphatiques, puis l'évaluation de leur capacité antioxydante en milieu émulsionné et en milieu homogène. Un effet négatif de la mono-estérification des acides phénoliques a été observé en milieu hétérogène montrant ainsi l'influence négative du groupement hydroxyle situé à l'extrémité de la chaîne alkyle. Un effet de seuil a été observé, en revanche, avec les deux familles de di-esters d'acides phénoliques, indiquant une amélioration de la capacité antioxydante jusqu'à un optimum correspondant à une longueur de chaîne alkyle particulière. Enfin, tous les mono- et di-esters testés en milieu homogène ont montré une capacité antiradicalaire plus faible que celle des acides phénoliques de départ correspondants.

Mots-clés : colza et tournesol, composés phénoliques, fractionnement par voie sèche, traitements enzymatiques, lipophilisation, capacité antioxydante

Valorization of rapeseed and sunflower phenolics : from the dry fractionation of raw materials to the synthesis of multifunctional molecules

Abstract :

Rapeseed and sunflower meals are highly abundant and protein-rich by-products mainly dedicated to animal feed. Besides, they also represent an interesting source of phenolic compounds with various bioactive and antioxidant properties, but widely untapped so far. In addition, the recovery processes of phenolic compounds are based on the use of solvents that generate effluents and may negatively affect the integrity of other meal constituents.

The first part of this work was devoted to the development of new separation processes of rapeseed and sunflower meal phenolic fraction. After an appropriate milling of the meals, the dry fractionation by electrostatic sorting or air classification allows the recovery of proteins and phenolics enriched fractions. In both cases, the particle-size distribution of milled meals has been of paramount importance on process efficiency. Electrostatic sorting lead to the highest enrichments in proteins and phenolics (up to two times more than in starting meals) with recovery yields around 30% after recycling. This step was followed by the extraction of phenolics using green hydro-alcoholic mixtures based on ethanol, as substitutes to methanol.

In the second part, we investigated the enzymatic production of sinapic and caffeic acids from rapeseed and sunflower meals or their extracts. Three recombinant cinnamoyl esterases from *A. niger* exhibiting different activities and selectivities were tested. Owing to the presence of active endogenous enzymes, the hydrolysis of non-thermally treated meals has led to a significant loss of phenolics. The issue was overcome by performing hydrolysis on the corresponding phenolic extracts. However, in case of rapeseed extract, acyl transfer reactions were detrimental to sinapic acid formation and yield.

Finally, in the last part, we synthesized mono- and di-esters of sinapic and caffeic acids with aliphatic α,ω -diols of increasing chain length, then we evaluated their antioxidant capacities in emulsion and in homogenous medium. A negative impact of the mono-esterification of the phenolic acid with the different aliphatic diols was observed in the heterogeneous medium, implying the negative influence of the hydroxyl group at the end of the alkyl chain. Conversely, a "cut-off" effect was observed for the two di-esters series showing an improvement of the antioxidant capacity until an optimum was reached for a particular alkyl chain. Finally, all the esters showed lower antiradical capacities in the homogenous medium compared to the corresponding starting phenolic acids.

Key words : rapeseed and sunflower, phenolic compounds, dry fractionation processes, enzymatic treatments, lipophilisation, antioxidant capacity

TABLE DES MATIERES

Travaux relatifs à cette thèse	7
Remerciements	8
Liste des figures	11
Liste des tableaux	14
Liste des schémas	16
Liste des abréviations	17
INTRODUCTION GÉNÉRALE	21
CHAPITRE 1 : ETAT DE L'ART	26
1. FILIERE OLEAGINEUSE ET CONTEXTE GENERAL.....	26
2. LE COLZA ET LE TOURNESOL.....	27
2.1. UTILISATIONS PRINCIPALES DES GRAINES.....	27
2.2. MORPHOLOGIE ET COMPARTIMENTATION DES GRAINES DE COLZA ET DE TOURNESOL.....	29
2.3. LES TOURTEAUX DE COLZA ET DE TOURNESOL.....	31
2.3.1. Les tourteaux comme sources de protéines	31
2.3.2. Facteurs antinutritionnels des tourteaux de colza et de tournesol	33
2.3.2.1. Les fibres.....	33
2.3.2.2. Les phytates.....	33
2.3.2.3. Les glucosinolates.....	33
2.3.2.4. Les composés phénoliques.....	34
2.3.3. Caractérisation fine des composés phénoliques de la graine de colza	35
2.3.3.1. Les tannins condensés.....	35
2.3.3.2. Les flavonoïdes	36
2.3.3.3. Les acides phénoliques et leurs dérivés	37
2.3.4. Caractérisation fine des composés phénoliques de graine de tournesol	38
2.3.4.1. Les flavonoïdes	38
2.3.4.2. Les acides phénoliques et leurs dérivés	38
2.4. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET BIOACTIVES DES COMPOSES PHENOLIQUES	39
2.4.1. Propriétés antioxydantes et antiradicalaires	40
2.4.2. Application des composés phénoliques à la maîtrise de l'oxydation lipidique.....	44
3. FRACTIONNEMENT PAR VOIE SECHE DE LA BIOMASSE	45
3.1. ETAPE DE BROUAGE.....	47

3.2.	ETAPE DE SÉPARATION.....	49
3.2.1.	Tri électrostatique	49
3.2.2.	Turbo-séparation.....	52
4.	PRETRAITEMENTS ENZYMATIQUES DES MATIERES PREMIERES POUR LA LIBERATION D'ACIDES PHENOLIQUES	53
4.1.	HYDROLYSE D'ESTERS D'ACIDES PHENOLIQUES PAR VOIE ENZYMATIQUE	55
4.1.1.	Production des FAEs	55
4.1.2.	Utilisation des feruloyl estérases pour la libération d'acides phénoliques.....	57
5.	EXTRACTION DES COMPOSES PHENOLIQUES SIMPLES DES TOURTEAUX DE COLZA ET DE TOURNESOL 60	
5.1.	EXTRACTIONS AUX SOLVANTS.....	60
5.2.	QUANTIFICATION DES COMPOSES PHENOLIQUES SIMPLES.....	62
6.	LA LIPOPHILISATION COMME OUTIL POTENTIEL D'AMELIORATION DE LA CAPACITE ANTIOXYDANTE	63
6.1.	METHODES D'EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE.....	64
6.2.	VOIES DE SYNTHESSES POUR LA LIPOPHILISATION DES COMPOSES PHENOLIQUES.....	66
6.2.1.	Voie chimique.....	67
6.2.2.	Voie enzymatique.....	69
6.2.3.	Voie chimio-enzymatique.....	70
6.3.	MISE EN EVIDENCE DE L'EFFET DE SEUIL DE L'HYDROPHOBIE SUR L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE EN SYSTEMES LIPIDIQUES DISPERSES.....	72
6.4.	EFFET DE LA LIPOPHILISATION DES ACIDES PHENOLIQUES SUR LEUR CAPACITE ANTIRADICALAIRE EN MILIEU HOMOGENE.....	75
7.	CONCLUSIONS ET OBJECTIFS.....	78
	CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES	80
1.	MATERIELS.....	80
1.1.	RÉACTIFS.....	80
1.2.	MATIÈRES PREMIÈRES	80
2.	METHODES	81
2.1.	METHODES CHROMATOGRAPHIQUES ANALYTIQUES ET PREPARATIVES.....	81
2.1.1.	Analyses par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)	81
2.1.1.1.	Détermination des teneurs en composés phénoliques individuels et totaux dans les échantillons de colza	81

2.1.1.2.	Détermination des teneurs en composés phénoliques individuels et totaux des échantillons de tournesol	82
2.1.2.	Caractérisation par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) des principaux composés phénoliques dans les extraits méthanoliques de tourteaux de colza et tournesol.	82
2.1.3.	Purification des produits d'estérification des acides sinapique et caféique avec les diols par chromatographie flash sur gel de silice	83
2.1.4.	Analyses par résonance magnétique nucléaire (RMN)	83
2.2.	PREPARATION DES TOURTEAUX DE COLZA ET TOURNESOL INDUSTRIELS ET NON-INDUSTRIELS.....	84
2.2.1.	Préparation du tourteau de colza non-industriel.....	84
2.2.2.	Préparation du tourteau de tournesol non-industriel	84
2.2.3.	PREPARATION DE TOURTEAUX INDUSTRIELS DE COLZA ET DE TOURNESOL.....	84
2.3.	PROCEDES DE FRACTIONNEMENT PAR VOIE SECHE DES TOURTEAUX NON INDUSTRIELS DE COLZA ET TOURNESOL.....	85
2.3.1.	Broyage ultra-fin.....	85
2.3.2.	Détermination de la distribution moyenne des tailles de particules	85
2.3.3.	Tri électrostatique	86
2.3.4.	TURBO-SEPARATION	87
2.4.	CARACTERISATIONS PHYSICO-CHIMIQUES DES FRACTIONS ISSUES DU FRACTIONNEMENT PAR VOIE SECHE.....	87
2.4.1.	Extraction des composés phénoliques de colza et tournesol	87
2.4.2.	Teneur en eau.....	88
2.4.3.	Teneur en cendres.....	88
2.4.4.	Teneur en protéines	89
2.4.5.	Teneur en huile.....	89
2.4.6.	Teneur en lignine.....	89
2.4.7.	Microscopie électronique à balayage (MEB).....	90
2.4.8.	Analyses statistiques	90
2.5.	METHODOLOGIE D'EXTRACTION DES COMPOSES PHENOLIQUES.....	91
2.6.	TRAITEMENT ENZYMATIQUES DES TOURTEAUX INDUSTRIELS ET NON INDUSTRIELS DE COLZA ET DE TOURNESOL.....	91
2.6.1.	Hydrolyse basique des tourteaux non industriels de colza et de tournesol et de ses extraits méthanoliques sec correspondants	91

2.6.2.	Optimisation de la concentration en enzyme pour l'hydrolyse enzymatique avec AnFaeB et ChIE des composés phénoliques du tourteau industriel de tournesol.	92
2.6.3.	Cinétique d'hydrolyse enzymatique des tourteaux non-industriels de colza et de tournesol et de ses extraits méthanoliques sec avec des esters carboxylique estérases	92
2.7.	ESTERIFICATION DES ACIDES SINAPIQUE ET CAFEIQUE AVEC DIFFERENTS α,ω -DIOLS A CHAÎNE ALIPHATIQUE COMPORTANT (n= 2 A 12) ATOMES DE CARBONE.....	94
2.7.1.	Mono-estérification en milieu fondu avec les α,ω -diols à n = 2, 4, 8 et 12	94
2.7.2.	Di-estérification des mono-esters d'acide phénoliques par la réaction de Mitsunobu.....	96
2.8.	EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE EN MILIEUX HOMOGENE ET HETEROGENE.....	98
2.8.1.	Evaluation de l'activité antioxydante des produits d'estérification par le test CAT (<i>Conjugated Autoxidizable Triene assay</i>)	98
2.8.2.	Mesure de l'activité antiradicalaire par la méthode DPPH•.....	101
CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION		105
PARTIE 1. CARACTÉRISATIONS CHIMIQUES DES MATIÈRES PREMIÈRES À BASE DE COLZA ET DE TOURNESOL.....		105
1.1.	CARACTERISATION FINE DES COMPOSES PHENOLIQUES SIMPLES DE COLZA ET DE TOURNESOL.....	105
1.2.	DETERMINATION DES CONCENTRATIONS EN PROTEINES, LIGNINE, HUMIDITE, CENDRES ET LIPIDES DES TOURTEAUX NON-INDUSTRIELS DE COLZA ET DE TOURNESOL.	111
PARTIE 2. SEPARATION DE LA FRACTION PHENOLIQUE DES TOURTEAUX DE COLZA ET DE TOURNESOL		112
2.1.	FRACTIONNEMENT PAR VOIE SECHE DES TOURTEAUX NON-INDUSTRIELS DE COLZA ET DE TOURNESOL POUR LA SEPARATION DE LEUR FRACTION PHENOLIQUE.....	112
2.1.1.	Effet du broyage ultrafin (UF) sur les caractéristiques physico-chimiques des tourteaux.....	113
2.1.2.	Séparation électrostatique des tourteaux de colza et de tournesol finement broyés	117
2.1.2.1.	Influence de la distribution des tailles de particules sur l'efficacité de la séparation et la composition des fractions produites	117
2.1.2.2.	Amélioration des rendements en fraction d'intérêt (FPe) par recyclage des fractions de collecte.....	123
2.1.3.	Turbo séparation des tourteaux finement broyés de colza et tournesol	126
2.1.3.1.	Influence du broyage UF préalable et de la vitesse de rotation du cylindre de tri ...	126
2.1.4.	Analyse de Microscopie Electronique à Balayage (MEB) des différentes fractions et matières premières	131
2.1.5.	Conclusions.....	132

2.2. METHODOLOGIE D'EXTRACTION DES COMPOSES PHENOLIQUES SIMPLES DES TOURTEAUX DE COLZA ET DE TOURNESOL	133
2.2.1. Mélanges hydro-alcooliques verts pour l'extraction des composés phénoliques.	134
2.2.2. Conclusions.....	136
PARTIE 3. TRAITEMENTS ENZYMATIQUES DES TOURTEAUX DE COLZA ET DE TOURNESOL POUR LA PRODUCTION D'ACIDES SINAPIQUE ET CAFEIQUE	138
3.1. DETERMINATION DES TENEURS REFERENCES EN DERIVES D'ACIDES PHENOLIQUES TOTAUX DES TOURTEAUX DE COLZA ETE DE TOURNESOL	140
3.2. TRAITEMENTS ENZYMATIQUES DU TOURTEAU DE TOURNESOL INDUSTRIEL : OPTIMISATION DE LA CONCENTRATION EN ENZYMES ANFAEB ET CHLE.....	142
3.3. HYDROLYSE ENZYMATIQUE DU TOURTEAU DE TOURNESOL NON-INDUSTRIEL ET DE SON EXTRAIT METHANOLIQUE SEC CORRESPONDANT, AVEC LES ENZYMES AnFaeB ET ChIE.	146
3.3.1. Hydrolyse enzymatique du tourteau non-industriel de tournesol avec AnFaeB et ChIE..	146
3.3.2. Hydrolyse enzymatique de l'extrait méthanolique sec de tourteau de tournesol non-industriel avec AnFaeB et ChIE	148
3.4. HYDROLYSE ENZYMATIQUE DU TOURTEAU DE COLZA NON-INDUSTRIEL OU DE SON EXTRAIT METHANOLIQUE SEC AVEC ANFAEA	153
3.4.1. Hydrolyse enzymatique sur le tourteau	153
3.4.2. Hydrolyse enzymatique sur extrait.....	156
3.5. CONCLUSIONS	159
PARTIE 4. SYNTHÈSE DES MONO- ET DI-ESTERS D'ACIDES PHÉNOLIQUES ET ÉVALUATION DE LEURS CAPACITÉS ANTIOXYDANTES EN MILIEU HÉTÉROGÈNE ET HOMOGÈNE	161
4.1. MONO-ESTERIFICATIONS DES ACIDES PHENOLIQUES EN MILIEU FONDU	162
4.2. DI-ESTERIFICATIONS DES ACIDES PHENOLIQUES EN MILIEU FONDU	166
4.3. CAPACITE ANTIOXYDANTE DES DIFFERENTS MONO- ET DI-ESTERS D'ACIDES PHENOLIQUES EN MILIEU EMULSIONNE ET EN MILIEU HOMOGÈNE.	168
4.3.1. Capacité antioxydante des mono-esters en émulsion	169
4.3.2. Capacité antioxydante des di-esters en émulsion.....	172
4.3.3. Capacité antiradicalaire des mono-esters en milieu homogène.....	173
4.3.4. Capacité anti radicalaire des di-esters en milieu homogène	176
4.4. CONCLUSION	178
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	181
Références bibliographiques	187

Travaux relatifs à cette thèse

Publications scientifiques :

- 1) **Oscar Laguna**, Abdellatif Barakat, Hadil Alhamada, Erwann Durand, Bruno Baréa, Frédéric Fine, Pierre Villeneuve, Morgane Citeau, Sylvie Dauguet, Jérôme Lecomte. *Production of proteins and phenolic compounds enriched fractions from rapeseed and sunflower meals by dry fractionation processes. Industrial Crops & Products*, 2018, 118, 160–172
- 2) Elise Odinet, Frederic Fine, Jean-Claude Sigoillot, **Oscar Laguna**, Jérôme Lecomte, David Navarro, Alexandra Bisotto, Toinou Frezouls, Corinne Peyronnet, Christian Ginies, Craig B. Faulds, Anne Lomascolo. A two-step bioconversion process for canolol production from rapeseed meal combining *Aspergillus niger* and *Neolentinus lepideus*. *Microorganisms*, 2017, 5(4), 67
- 3) **Oscar Laguna**, Elise Odinet, Alexandra Bisotto, Jean-Claude Sigoillot., Frédéric Fine, Pierre Villeneuve, Anne Lomascolo and Jérôme Lecomte. Quantitative production of phenolic acids from rapeseed and sunflower meals or their corresponding dry methanolic extracts using different carboxylic esters hydrolases from *Aspergillus niger*. *En préparation pour Bioresource technology*

Communications orales en congrès internationaux :

- 1) *Valorization of phenolic compounds and proteins in rapeseed and sunflower meals.* **Oscar Laguna**, Abdellatif Barakat, Hadil Alhamada, Erwann Durand, Bruno Baréa, Frédéric Fine, Pierre Villeneuve, Morgane Citeau, Sylvie Dauguet, Jérôme Lecomte. 15th Euro Fed Lipid Congress 27-30 August 2017, Upssala, Sweden.
- 2) *Synthesis of mono- and di-esters of phenolic acids from oleaginous meals, and evaluation of their antioxidant activity in emulsion.* **Oscar Laguna**, Erwann Durand, Bruno Baréa, Pierre Villeneuve, Jérôme Lecomte. 16th Euro Fed Lipid Congress 16-19 September 2018, Belfast, United-Kingdom.

Communications par affiche:

- 1) *Valorization of rapeseed meal proteins and phenolics by dry fractionation processes* **Oscar Laguna**, Abdellatif Barakat, Hadil Alhamada, Erwann Durand, Bruno Baréa, Frédéric Fine, Pierre Villeneuve, Morgane Citeau, Sylvie Dauguet, Jérôme Lecomte. Séminaire P.I.V.E.R.T 21-22 juin 2017, Bordeaux, France.

Remerciements

Je réserve cette partie de mon manuscrit en guise de reconnaissance et gratitude aux personnes qui ont été à mes côtés pour le développement de ce travail de thèse.

Ce travail a été réalisé, en partenariat avec la SAS PIVERT, dans le cadre de l'Institut pour la Transition Energétique (ITE) P.I.V.E.R.T. (www.institut-pivert.com) retenu parmi les Investissements d'Avenir. Ce travail a bénéficié d'une aide de l'Etat au titre du Programme d'Investissements d'Avenir portant la référence ANR-001-01. J'adresse donc ma reconnaissance à la SAS PIVERT ainsi qu'au CIRAD pour leur contribution au financement de cette thèse.

J'adresse aussi ma gratitude à l'ensemble de l'équipe du CIRAD, UMR IATE pour m'avoir accueilli pendant ces trois dernières années. J'aimerais que vous sachiez que c'est en grande partie grâce à vous que j'ai réussi à accomplir tous mes objectifs de thèse. Je vous remercie pour votre chaleur humaine qui a rendu cette expérience agréable. Merci pour tous les bons moments qu'on a passés ensemble : pic-nic, tournoi de ping-pong, sessions de pétanque, etc.

Je remercie vivement le Dr. Pierre Villeneuve de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ma thèse au sein de son équipe. Tu m'as toujours encouragé pour donner le meilleur de moi. Pendant ces trois ans, j'ai pu apprécier ta bonne humeur, ta patience et j'ai appris grâce à toi une excellente leçon de vie que je n'oublierai jamais. Je te serai toujours reconnaissant pour ça.

J'adresse ma plus grande reconnaissance à mon directeur de thèse, le Dr. Jérôme Lecomte, pour m'avoir accordé sa confiance pendant ces trois dernières années. Merci pour ton assistance et tes judicieux conseils. Pendant tout ce temps, tu m'as guidé et tu m'as appris la vraie signification des mots « rigueur » et « persévérance ». Je te remercie non seulement pour tes qualités scientifiques et professionnelles mais aussi pour ta patience.

Je tiens également à remercier tous les membres du jury : Dr. Marie-Hélène Ropers, Prof. Catherine Sarazin, Dr. Valérie Lullien-Pellerin, Dr. Frédéric Carrière, Dr. Romain Kapel et Dr. Jérôme Le Nôtre, pour avoir accepté de juger ce travail et de participer à ce jury.

Un grand merci au Dr. Erwann Durand pour ses conseils et son écoute. Depuis le début de cette thèse, tu as toujours été présent pour moi comme encadrant et comme ami. Ton appui aux niveaux professionnel et personnel m'a donné le courage d'aller jusqu'au bout et je vois en toi le chercheur que j'aimerais devenir dans un futur. Tu es une personne remarquable et je suis content d'avoir fait ta connaissance. Merci également pour avoir cru en moi pendant les épreuves sportives du CIRAD, Entr'Act qu'on a gagné en partie grâce à tes entraînements !!!

J'aimerais également remercier sincèrement le Dr. Maria Figueroa et le Dr. Claire Bourlieu. Je vous remercie infiniment de tout le soutien moral que j'ai eu de votre part. J'ai beaucoup apprécié la gentillesse et la chaleur humaine que vous apportez quotidiennement à l'équipe.

Bruno, merci énormément pour ton aide au niveau professionnel mais aussi au niveau personnel. Tu étais toujours là pour m'aider à chaque fois que j'avais un problème (avec la HPLC ou avec mon vélo !). Merci pour ta gentillesse et les moments de détente pendant les grandes périodes de stress (surtout à la fin).

Merci aussi à toute l'équipe Caoutchouc pour votre compagnie au quotidien : Fred, Jérôme, Max, Christine et KARIM (merci pour ton amitié mon ami, VIVA MEXICO GUEY !).

Ma reconnaissance va également au Dr. Anne Lomascolo et à Elise Odinet de l'équipe Biodiversité et Biotechnologie Fongiques de Marseille qui m'ont aidé pendant toute la partie enzymologie. Merci pour votre disponibilité, réactivité et surtout vos conseils qui m'ont permis de réaliser une partie de ce travail de thèse. Mais aussi, merci pour vos enzymes sans lesquelles, ce travail ne serait pas une réalité !

A tous les collègues du bâtiment 32, merci pour votre amitié : Julien, Maeva et Anne-Hélène (je sais, tu n'es plus au 32). Merci d'avoir partagé avec moi les midis à la cantine mais aussi pour les soirées raclette/tartiflette et au jeu limite limite !!

Un grand merci aussi à tous mes colocataires de bureau : Mariana, Samantha, Amal, Célia, Mélina et Charlotte ! Au cours de ces trois ans de thèse, vous êtes devenues comme une famille pour moi. Merci pour les poissons et crevettes qui disparaissaient mystérieusement, les soirées, les raclettes (merci pour l'organisation Charlotte !), la carboglace (Charlotte et Mélina !), les sessions de squash et votre bonne humeur !

J'aimerais aussi remercier l'ensemble des doctorants de l'UMR IATE que j'ai rencontré pendant ces trois ans de thèse : Grégoire, Valentin, Daniel, Antoine, Quentin, Karsta, Anaïs, Julien, Laure, etc... C'était une très agréable surprise de rencontrer des personnes comme vous. Je n'oublierai jamais le voyage à Berlin et le petit expresso que j'ai commandé dans un « beers garden ». Si je pouvais revenir en arrière, je prendrais un allongé !

Guilherme de Oliveria, merci beaucoup pour ton amitié. Sos una persona excelente y agradezco mucho el apoyo moral que he recibido de tu parte.

Merci aussi à tous les étudiants, stagiaires et doctorants, qui sont passés de façon sporadique dans cette équipe : André « Dey-dey », Sasha, Nicolas, Paul Alain, Valentin et mon ami brésilien Bruno Oliveira (fue un placer el haberte conocido Bruninho).

Egalement, j'aimerais remercier Théo « merguez » Guez pour son amitié pendant toutes ces années. Tu m'as accompagné pendant toute ma thèse et tu as toujours été présent pour me remonter le moral avec une petite bière.

Giuliano Cutolo, mon ami italien, merci beaucoup pour ton soutien moral à distance.

A mes amis Salvadoriens qui ont toujours cru en moi : Fernando, Rodrigo, Juan, Ivan, Alex, Will, Guillermo y Balaram (adoptatado). Muchisimas gracias por su apoyo a la distancia. ¡Porque son pocos como nosotros!

Je voudrais adresser un grand merci à la personne qui a toujours été à mes côtés pendant cette thèse. Fanny, mon amour, merci énormément pour ton soutien au quotidien. Tu as été une source d'inspiration pour moi. Tu es une personne admirable et c'est en grande partie grâce à toi que j'ai pu réaliser ce travail. Tu es la meilleure rencontre que j'ai pu faire pendant ma thèse et ma vie.

A mes sœurs, Mayela et Tatiana, merci beaucoup pour votre soutien et vos encouragements à distance.

*Finalmente, quisiera agradecer fuertemente a mi madre por todo su apoyo durante todo este tiempo. Madre mía, tu has sido la fuente de inspiración más grande que he tenido. Estos últimos momentos han sido increíblemente difíciles para mí. A pesar de tus problemas, siempre estuviste escuchándome y aconsejándome. Nunca perdiste el buen humor ni las ganas de seguir adelante. Tus ganas de vivir me dieron las energías necesarias para continuar con mi trabajo. Gracias por tus enseñanzas y sabiduría que me han permitido llegar hasta donde estoy en estos momentos. **Este trabajo te lo dedico a ti.***

Liste des figures

Figure 1 : Distribution géoagronique des cultures de colza, tournesol et soja en France	27
Figure 2 : Composition chimique des graines de colza (A) et de tournesol (B).	28
Figure 3 : Morphologie et compartimentation des graines de colza (A), tournesol (B) et coque de tournesol (C) et couleurs des différents constituants des graines : pellicules de colza (D), amandes de colza (E), coques de tournesol (F) et amandes de tournesol (G).	30
Figure 4 : Corps protéiques, lipidiques et membranes de la radicule (A) et du cotylédon (B) de la graine de colza et de l'embryon (C) de la graine de tournesol..	30
Figure 5 : Composition chimique des tourteaux de colza (A), tournesol (B) et tournesol décortiqué (C)..	32
Figure 6 : Classification simplifiée des composés phénoliques.....	34
Figure 7 : Les différentes sous-unités des tannins condensés de pellicules de colza.	36
Figure 8 : Structure de base des flavonoïdes.	37
Figure 9 : Structure des principaux composés phénoliques de colza.	37
Figure 10 : Structure des principaux composés phénoliques de tournesol.....	39
Figure 11 : Structures des acides hydroxycinnamiques.	41
Figure 12 : Quelques exemples de contraintes mécaniques	47
Figure 13 : Schéma simplifié des étapes de recyclage réalisées par Wang <i>et al.</i> (2016).	51
Figure 14 : Rendement de récupération cumulé et teneur en protéines après chaque étape de recyclage de la farine de pois	52
Figure 15 : Liaisons éther et ester entre la lignine et les unités hydroxycinnamates.	54
Figure 16 : Structure chimique de l'acide α -éléostéarique	66
Figure 17 : Mécanisme de la réaction de Mitsunobu appliquée à la synthèse de phénolipides.	68
Figure 18 : Effet de la concentration en enzyme sur le rendement de formation des chlorogénates de butyle (\square), octyle (\blacktriangle), dodécyle (\blacklozenge) et hexadécyle (o) pendant l'estérification de l'acide chlorogénique (A) et la transestérification du chlorogénate de méthyle (B).	71
Figure 19 : Influence de la longueur de la chaîne alkyle sur la capacité antioxydante des chlorogénates (A) et rosmarinates (B) d'alkyles dans une micro-émulsion d'huile de tung sans tocophérols et stabilisée avec du Brij 35	73
Figure 20 : Structure des mono-esters d'acide sinapique et différents α,ω -diols aliphatiques (n = 2, 4, 8, 12).....	95
Figure 21 : Structure des mono-esters d'acide caféique et différents α,ω -diols aliphatiques (n = 2, 4, 8, 12).	95
Figure 22 : Structure des di-esters d'acide sinapique avec différentes chaînes aliphatiques (n = 2, 4, 8, 12).	97
Figure 23 : Structure des di-esters d'acide caféique avec différentes chaînes aliphatiques (n = 2, 4, 8, 12).	98
Figure 24 : Courbes de calibration du radical DPPH $^{\bullet}$ solubilisé dans MeOH ou EtOH.	101
Figure 25 : Exemple classique de l'évolution du % de radical DPPH $^{\bullet}$ au cours du temps dans des solutions contenant une molécule antiradicalaire à différentes concentrations.....	103

Figure 26 : Exemple de la détermination de l'activité antiradicalaire d'un antioxydant exprimée en EC ₅₀ ou n ^{es}	103
Figure 27 : Profil HPLC à 328 nm d'un extrait méthanolique de tourteau de colza non-industriel.....	106
Figure 28 : Profil HPLC à 326 nm d'un extrait méthanolique de tourteau de tournesol non-industriel. .	108
Figure 29 : Concentration en sinapine, acide chlorogénique et CPT des tourteaux industriels et non-industriels de colza (A) et de tournesol (B).	110
Figure 30 : Influence de la taille des trous de la grille de broyage sur la D ₅₀ des tourteaux de colza et de tournesol.	115
Figure 31 : Distribution des tailles de particules des échantillons de colza (A) et de tournesol (B) obtenus après broyage UF avec différentes tailles de grilles.....	116
Figure 32 : Schéma simplifié du procédé de tri électrostatique.	117
Figure 33 : Caractérisation des fractions de colza (A) et de tournesol (B) obtenues après une seule étape de séparation électrostatique, en fonctions des différentes tailles de grilles.....	118
Figure 34 : Quelques exemples de fractions obtenues après séparation électrostatique des tourteaux de colza et de tournesol	120
Figure 35 : Distribution des tailles de particules des échantillons de colza (A) et de tournesol (B) avant (pointillés) et après séparation électrostatique (traits pleins).....	121
Figure 36 : Rendement cumulé de récupération des fractions TxC-FPe-0,1 (A-1) et TxT-FPe-0,5. Evolution des teneurs en protéines et CPT des fractions TxC-FPe-0,1 (A-2) et TxT-FPe-0,5 (B-2) en fonction du nombre d'étapes de recyclage.....	124
Figure 37 : Teneurs en protéines et en CPT des fractions FF et fraction FG des tourteaux finement broyés de colza (A-1 et A-2) et de tournesol (B-1 et B-2) après turbo-séparation.	127
Figure 38 : Distribution des tailles de particules des échantillons de colza (A) et de tournesol (B) avant (pointillés) et après turbo-séparation (traits pleins).....	129
Figure 39 : Images de MEB de divers échantillons de colza et de tournesol.....	131
Figure 40 : Extraction des composés phénoliques du tourteau TxC-0,1 avec EtOH et iPrOH en mélange avec de l'eau à différents pourcentages	135
Figure 41 : Extraction des composés phénoliques du tourteau TxT-0,5 avec EtOH et iPrOH en mélange avec de l'eau à différents pourcentages	136
Figure 42 : Cinétiques d'hydrolyse des esters d'acide caféique présents dans le tourteau industriel de tournesol avec différentes concentrations en ChIE (A) et AnFaeB (B).....	144
Figure 43 : Chromatogrammes obtenus après hydrolyse enzymatique en présence de 20 nkat de AnFaeB/g de tourteau (A) et 30 nkat de ChIE/g de tourteau (B) à t = 0 min (rouge) et t = 240 min (noir) à 326 nm.	145
Figure 44 : Cinétiques d'hydrolyse du tourteau de tournesol non-industriel avec à 30 nkat de AnFaeB/g de tourteau (A) et 10 nkat de ChIE/g de tourteau (B), à 50°C et pH6.....	147
Figure 45 : Cinétiques d'hydrolyse de l'extrait méthanolique de tournesol non-industriel avec 30 nkat de AnFaeB/g de tourteau à 50°C (A) et 37°C (B).	149
Figure 46 : Cinétiques d'hydrolyse de l'extrait méthanolique de tournesol non-industriel avec 10 nkat de ChIE /g de tourteau à 50°C (A) et 37°C (B).	150

Figure 47 : Cinétiques d'hydrolyse des différents esters d'acides caféiques présents dans l'extrait méthanolique de tourteau de tournesol non-industriel avec 10 nkat de ChIE /g de tourteau à 50°C (A) et 37°C (B).....	151
Figure 48 : Hydrolyse des tourteaux de colza non-industriel (A) et industriel (B) avec 39 nkat de AnFaeA/g de tourteau à 55°C et pH 5,5.....	154
Figure 49 : Chromatogrammes obtenus après hydrolyse enzymatique du tourteau non-industriel de colza (A) et de son extrait méthanolique sec correspondant (B) à t = 0 min (rouge) et à t = 240 min (noir) à 323 nm.....	155
Figure 50 : Hydrolyse de l'extrait méthanolique de tourteau de colza non-industriel avec 39 nkat de AnFaeA /g de tourteau à 55°C (A) et 37°C (B) et pH 5,5.....	157
Figure 51 : Schéma réactionnel de mono-estérification des acides phénoliques en milieu fondu.	163
Figure 52 : Cinétiques d'estérification de l'acide sinapique en présence de différents diols par HPLC-UV à 328 nm.....	164
Figure 53 : Cinétiques d'estérification de l'acide caféique en présence de différents diols par HPLC-UV à 328 nm.....	165
Figure 54 : Rendement après purification des différents mono-esters.....	166
Figure 55 : Schéma réactionnel des réactions de di-estérification des acides phénoliques via la réaction de Mitsunobu.	166
Figure 56 : Rendement après purification des différents di-esters d'acides sinapique et caféique	167
Figure 57 : Valeurs CAT des mono-esters d'acide sinapique (A) et d'acide caféique (B) à chaîne alkyle de 2 à 12 carbones..	170
Figure 58 : Valeurs CAT des di-esters d'acide sinapique (A) et d'acide caféique (B) à chaîne alkyle de 2 à 12 carbones.	173
Figure 59 : Capacité antiradicalaire des mono-esters d'acide sinapique (A) et d'acide caféique (B) à chaîne alkyle de 2 à 12 carbones.	174
Figure 60 : Capacité antiradicalaire des di-esters d'acide sinapique (A) et d'acide caféique (B) à chaîne alkyle de 2 à 12 carbones.	177

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition relative (%) en acides gras des huiles des graines de colza et de tournesol.	29
Tableau 2 : Résultats obtenus après broyage des graines de pois utilisant un broyage à impact ou impact et friction, à différentes vitesses du rotor de tri	48
Tableau 3 : Séparation électrostatique des tourteaux de colza et de tournesol réalisée par Barakat <i>et al.</i> (2015) et Basset <i>et al.</i> (2016).	50
Tableau 4 : Différents types de FAEs ainsi que leur spécificité envers les esters d'acides hydroxycinnamiques	56
Tableau 5 : Libération d'acides phénoliques de différentes matières premières agricoles par l'action de FAEs.	58
Tableau 6 : Quelques exemples de méthodes d'extraction des composés phénoliques simples des tourteaux de colza et de tournesol.	61
Tableau 7 : Quantification des composés phénoliques individuels par HPLC-UV et détermination des CPT par HPLC et méthode de F-C des graines, gâteaux et tourteaux de colza réalisée dans l'étude de Khattab <i>et al.</i> (2010).	63
Tableau 8 : Quelques exemples de synthèse de phénolipides (esters aliphatiques d'acides phénoliques) par réaction de Fisher.....	67
Tableau 9 : Quelques exemples de synthèse de phénolipides (esters d'acides phénoliques) par voie enzymatique.....	70
Tableau 10 : Capacité antiradicalaire de différents acides phénoliques et leur ester correspondant avec l'octanol.....	76
Tableau 11 : Paramètres antiradicalaires de l'acide chlorogénique et ses esters, aux premiers instants (n^{ei}) et à l'état stationnaire (n^{es}).	77
Tableau 12 : Différentes concentrations en H ₂ O utilisées en fonction de chaque alcool pour l'extraction des composés phénoliques des tourteaux de colza et de tournesol.	91
Tableau 13 : Paramètres de l'hydrolyse enzymatique en fonction de la matière première employée et de l'enzyme testée.	93
Tableau 14 : Données de RMN ¹³ C et ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) des mono-esters d'acide sinapique avec différents α,ω-diols aliphatiques (n = 2, 4, 8 et 12).	95
Tableau 15 : Données de RMN ¹³ C et ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) des monoesters d'acide caféique avec différents α,ω-diols aliphatiques (n = 2, 4, 8 et 12).	96
Tableau 16 : Données de RMN ¹³ C et ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) des diesters d'acide sinapique avec différents α,ω-diols aliphatiques (n = 2, 4, 8 et 12)	97
Tableau 17 : Données de RMN ¹³ C et ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) des diesters d'acide caféique avec différents α,ω-diols aliphatiques (n = 2, 4, 8 et 12).	98
Tableau 18 : Principaux composés phénoliques de l'extrait méthanolique de tourteau non-industriel de colza identifiés par HPLC-MS.....	107
Tableau 19 : Composition de l'extrait méthanolique du tourteau non-industriel de tournesol.....	109
Tableau 20 : Composition moyenne des tourteaux non-industriels de colza et de tournesol.....	111

Tableau 21 : Teneurs en protéines et CPT des coques, pellicules et amandes de colza et de tournesol délipidées, issues d'échantillons non traités thermiquement.	111
Tableau 22 : Taille des particules, rendement de récupération et composition des tourteaux broyés UF de colza et de tournesol.	114
Tableau 23 : Caractérisation physico-chimique des tourteaux TxC-0,1 (Colza) et TxT-0,5 (tournesol), ainsi que leurs fractions FPe et FNe respectives, obtenues après séparation électrostatique.....	123
Tableau 24 : Distribution des tailles de particules, rendement et composition des fractions FF des échantillons de colza et tournesol obtenues après turbo-séparation à différentes vitesses de rotation	128
Tableau 25 : Caractérisation physico-chimique des fractions FF et FG obtenues après turbo séparation des tourteaux initiaux F0.	130
Tableau 26 : Principaux composés phénoliques individuels et dérivés d'acide sinapique totaux (DAST) [ou dérivés d'acide caféique totaux (DACT)] des tourteaux de colza (ou de tournesol) industriels et non-industriels.	141
Tableau 27 : Concentrations en acide caféique, DACT et rendements d'hydrolyse (%) global et spécifique après traitement enzymatique du tourteau industriel et de l'extrait méthanolique de tourteau non-industriel de tournesol avec AnFaeB et ChIE à 50°C.	152
Tableau 28 : Concentration en acide sinapique, DAST et rendements d'hydrolyse (%) après hydrolyse enzymatique des tourteaux industriel et non-industriel de colza et de l'extrait méthanolique sec du tourteau non-industriel de colza avec AnFaA à 55°C et 37°C	159
Tableau 29 : Différents paramètres antiradicalaires des acides phénoliques et du Trolox.....	175

Liste des schémas

Schéma 1 : Schéma simplifié de la bioraffinerie des oléagineux et principaux marchés associés.	46
Schéma 2 : Principe du tri électrostatique.	49
Schéma 3 : Principe de la turbo-séparation.	53

Liste des abréviations

3,4-di-CQA : Acide 3,4-di-*O*-caféoylquinique

3,5-di-CQA : Acide 3,5-di-*O*-caféoylquinique

3-CQA : Acide 3-caféoylquinique

4,5-di-CQA : Acide 4,5-di-*O*-caféoylquinique

4-CQA : Acide 4-caféoylquinique

5-CQA : Acide 5-caféoylquinique

Å : Ångström

AAPH : 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochlorydrique

ABTS : Acide 2,2-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique

AC : Acide caféique

AcOEt : Acétate d'éthyle

AnFaeA : Feruloyl estérase de type A produite par *Aspergillus niger*

AnFaeB : Feruloyl estérase de type B produite par *Aspergillus niger*

ANOVA : Analyse de variance

AOx : Antioxydant

AS : Acide sinapique

ASC : Aire sous la courbe

BHA : 2- et 3-tertiobutyl-4-hydroxyanisole

BHT : 2,6-di-tertiobutyl-4-méthylphénol

BODIPY : bore-dipyrométhène

BTHQ : 2-tert-butylhydroquinone

CAT : Triènes Conjugués Autooxydables

CCI : Couche compressée interne

ChIE : Chlorogénate estérase

CM : Couche moyenne

CPT : Composés phénoliques totaux

CTPD : Coques de tournesol partiellement délipidés

CUPRAC : Cupric reducing antioxidant capacity

D₅₀ : Taille moyenne des particules

DACT : Dérivés d'acide caféique totaux

DAST : Dérivés d'acide sinapique totaux

DEAD : Azodicarboxylate de diéthyle

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DMSO-d₆ : Diméthylsulfoxyde deutéré

DPPH• : Radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

DPPH-H : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine

EAC : Equivalents d'acide chlorogénique

EACa : Equivalents d'acide caféique

EAS : Equivalents d'acide sinapique

EC₅₀ : Quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer de 50 % de la concentration initiale en DPPH• dans le milieu

Ep : Epiderme

ESI : Ionisation de type électro-nébulisation

EtOH : Ethanol

FAEs : Feruloyl estérases

F-C : Folin-Ciocalteu

FC : Fraction de collecte

FC-R : Fraction de collecte recyclée

FF : Fraction fine

FG : Fraction grossière

FNc : Fraction négative de collecte

FNe : Fraction négative de l'électrode

FOP : Fédération française des producteurs d'oléagineux et de protéagineux

FPc : Fraction positive de collecte

FPe : Fraction positive de l'électrode

FRAP : Ferric reducing antioxidant power

H/E : Huile/eau
HABA : Acide 2,4-hydroxyphenylazobenzoïque
hp : Hypoderme
HPLC : Chromatographie en phase liquide haute performance
iCAL-B : Lipase B de *Candida antarctica* immobilisée
iPrOH : Isopropanol
LCC : Longueur de chaîne critique
LC-MS : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
MEB : Microscopie Electronique à Balayage
MeOH : Méthanol
MOPS : Acide 3-morpholino-1-propanesulfonique
MS : Matière sèche
MSD : Matière sèche délipidée
n.d. : Non déterminé
 n^{ei} : Stœchiométrie initiale
 n^{es} : Stœchiométrie réelle à l'état stationnaire
ORAC : Oxygen radical absorbance capacity
PAs : Proanthocyanidines
PBS : Solution de tampon phosphate
Ppm : Partie par million
RMN : Résonance magnétique nucléaire
SFA : Albumine de tournesol
SN₂ : Substitution nucléophile bimoléculaire
SNP : Sinapine
SG : Sinapoyl glucose
t.a. : Température ambiante
TE : Tri électrostatique
THF : Tétrahydrofurane
Tpm : Tour par minute

TPP : Triphénylphosphine

TRAP : Total peroxy radical-trapping potential

TS : Turbo-séparation

UF : Ultra fin

UV : Ultraviolet

INTRODUCTION GENERALE

Le colza et le tournesol sont deux plantes oléagineuses principalement cultivées pour la production d'huile végétale. En France, 5,478 Mt de graines de colza et 1,248 Mt de graines de tournesol ont été produites en 2018, ce qui fait de la France le premier producteur de graines oléagineuses de l'Union Européenne (Estimations FranceAgriMer, 2018). L'huile de ces graines est utilisée dans l'industrie alimentaire et elle est considérée comme bénéfique pour la santé humaine grâce à leurs fortes teneurs en acides mono- et polyinsaturés et en tocophérols (Luigicioni, 2005; Shahidi, 1990). Par ailleurs, l'huile de ces graines est largement utilisée pour la production d'énergies renouvelables ou en chimie verte pour la production de diverses commodités (Borredon *et al.*, 2011; Fine *et al.*, 2015). Les principaux coproduits issus des procédés de trituration et déshuilage de ces graines sont les tourteaux. En 2016, la France a produit 2,6 Mt de tourteaux de colza et 0,680 Mt de tourteaux de tournesol (fiche qualité Terres Univia, 2016). Ces matières premières hétérogènes sont principalement utilisées en alimentation animale en raison de leur forte teneur en protéines, environ 36 % MSD (matière sèche délipidée) pour le tourteau de colza et environ 28% MSD pour le tourteau de tournesol. Néanmoins, la présence d'un certain nombre de facteurs antinutritionnels, tels que la lignocellulose ou les composés phénoliques, diminuent leurs qualités nutritionnelles. Dans le cas des composés phénoliques, ils peuvent s'oxyder par voie enzymatique ou en milieu alcalin, et former des o-quinones. Ces produits d'oxydation peuvent ensuite réagir avec les acides aminés des protéines des tourteaux provoquant un brunissement et une modification des caractéristiques organoleptiques (Ozdal *et al.*, 2013).

Dans le tourteau de colza, les composés phénoliques représentent entre 1 et 2 % MSD du tourteau (Baumert *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2015). En revanche, pour le tourteau de tournesol, les composés phénoliques représentent entre 1 et 4% MSD (Weisz *et al.*, 2009). Ces composés phénoliques se trouvent principalement dans les amandes sous forme d'esters d'acides hydroxycinnamiques et en moindre quantité dans les pellicules de colza et les coques de tournesol. Pour le tourteau de colza, les composés phénoliques sont tous des esters d'acide

sinapique, la sinapine étant le composé phénolique majeur représentant jusqu'à 80 % des composés phénoliques totaux (CPT) en masse (Naczek *et al.*, 1998). Pour le tourteau de tournesol, les esters d'acide caféique sont les composés phénoliques majoritaires, l'acide 5-caféoylquinique représentant environ 70% des CPT en masse (Guo *et al.*, 2017; Karamać *et al.*, 2012). De façon générale, la présence d'un ou plusieurs groupements hydroxyle dans leur cycle aromatique, confère aux composés phénoliques, tels que les acides phénoliques, des propriétés antioxydantes, anti radicalaires, anti UV ou même antibactériennes (Shahidi and Ambigaipalan, 2015).

Au regard de ce qui précède, la séparation des composés phénoliques des tourteaux de colza et de tournesol peut être envisagée comme une double valorisation de ces matières premières :

- (i) Premièrement, la séparation des composés phénoliques permettrait d'améliorer la qualité nutritionnelle des tourteaux de colza et de tournesol
- (ii) deuxièmement, les composés phénoliques pourraient être valorisés, tels quels ou après fonctionnalisation, en fonction des propriétés recherchées (antioxydantes, antimicrobiennes, anti-UV...) ou comme précurseurs de matériaux.

Généralement, l'extraction des composés phénoliques ou des protéines nécessite des solvants, ou des conditions alcalines qui sont coûteuses, génératrices d'effluents, et agressives vis-à-vis des autres constituants des matières premières (Barakat and Rouau, 2014). Le fractionnement par voie sèche constitue une alternative prometteuse à l'extraction par solvants. Développé récemment, ce type de procédé a été utilisé pour la séparation des différents constituants de matières premières issues de l'industrie agroalimentaire tels que les tourteaux oléagineux. S'il a déjà été appliqué aux tourteaux de colza et de tournesol pour la séparation des fractions protéique et lignocellulosique (Barakat *et al.*, 2015; Basset *et al.*, 2016), les données concernant le devenir des composés phénoliques simples après les différentes étapes du fractionnement n'ont pas été précisées, ce à quoi nous nous sommes attachés à faire dans cette thèse.

Par ailleurs, cette fraction phénolique des tourteaux de colza et de tournesol, constituée majoritairement d'esters d'acides phénoliques, peut être hydrolysée pour produire des acides

phénoliques. Ainsi, ces tourteaux pourraient être valorisés comme source d'antioxydants naturels. Ces esters peuvent être hydrolysés par voie alcaline ou par voie enzymatique avec, par exemple, des feruloyl estérases. Ce type d'enzyme fait partie de la famille des esters d'acide carboxylique estérase et sont capables de libérer des acides phénoliques estérifiés aux parois cellulaires des plantes ou au réseau lignocellulosique (Benoit *et al.*, 2008; Gopalan *et al.*, 2016). Dans la nature, Il existe plusieurs types de feruloyle estérases. Par exemple, la feruloyl estérase de type A possède une activité envers les substrats contenant des groupements méthoxy sur le cycle phénolique, tels que les dérivés d'acides sinapique ou férulique. En revanche, la feruloyl estérase de type B possède une activité envers les substrats contenant des groupements hydroxyles, tels que les dérivés d'acide caféique. Ainsi, plusieurs études ont montré la faisabilité de réaliser l'hydrolyse des esters d'acide sinapique du tourteau de colza en présence de feruloyl estérases de type A (Odinot *et al.*, 2017; Vuorela *et al.*, 2004). En revanche, il n'existe pas de données de la littérature relatives à l'utilisation d'enzymes pour la libération d'acide phénoliques à partir de tourteaux de tournesol. Cela nous a conduit à envisager cette voie de production d'acide caféique, tout comme le traitement enzymatique de tourteaux de colza et tournesol non-traités thermiquement, en collaboration avec Anne Lomascolo (UMR1163 Biodiversité et Biotechnologie Fongiques, INRA, Aix Marseille Université, Marseille), spécialiste de la production et de l'utilisation de féruloyl estérases recombinantes d'*A. niger*.

Bien que les acides phénoliques soient de puissants antioxydants, leur activité dans des matrices lipidiques multiphasiques est souvent limitée du fait de leur polarité élevée (Lopez Giraldo, 2009). De nombreuses études ont montré que l'estérification des acides phénoliques, avec des longueurs de chaînes alkyles adéquates permettait d'améliorer leur capacité antioxydante dans de tels systèmes. Cette amélioration, fut attribuée au caractère amphiphile apporté par la chaîne carbonée permettant un positionnement optimal de l'antioxydant à l'interphase Huile/Eau, où l'oxydation à lieu (Laguerre *et al.*, 2009). Généralement, ces réactions d'estérification, appelées aussi réactions de lipophilisation, sont réalisées sur la fonction carboxylique de l'acide phénolique avec des alcools aliphatiques. A ce jour, il n'existe aucune donnée concernant la mono-estérification des acides phénoliques avec des diols aliphatiques. Nous nous sommes donc intéressés, à ces nouveaux types de « phénolipides » à base d'acides sinapique et caféique, et

contenant une fonction hydroxyle au bout de chaîne alkyle en attendant de cette modification une amélioration du caractère amphiphile des esters et donc de leur capacité antioxydante. En outre, nous avons également envisagé l'estérification de l'hydroxyle à l'extrémité de la chaîne alkyle par une deuxième unité d'acide phénolique pour accéder à des structures à deux noyaux phénoliques (di-esters correspondants) dont la capacité antioxydante peut être potentiellement doublée.

Le présent manuscrit est structuré en trois chapitres :

Le premier chapitre « Etat de l'art » consiste en une synthèse bibliographique comprenant une introduction générale consacrée à la filière oléagineuse et son contexte, en accordant une attention particulière aux produits et co-produits de trituration des graines de colza et de tournesol en termes d'utilisation et de composition. A cette occasion une description des composés phénoliques simples et de leurs propriétés bioactives et physico-chimiques est donnée. La deuxième partie de l'étude bibliographique est réservée à la description des procédés de fractionnement par voie sèche, des traitements enzymatiques pour la production d'acides phénoliques et des méthodologies d'extraction des composés phénoliques des tourteaux de colza et de tournesol par voie liquide. Finalement, un focus sur les différentes voies de synthèses des phénolipides et sur les méthodologies de mesure de la capacité antioxydante en milieu hétérogène et en milieu homogène clôture ce chapitre.

Le deuxième chapitre intitulé « Matériels et Méthodes » est consacré à la description des matières premières, des modes opératoires et des techniques expérimentales employés tout au long de ce travail de thèse.

Dans le dernier chapitre sont présentés l'ensemble des résultats et des discussions associées :

- (i) à la caractérisation chimique des tourteaux de colza et de tournesol industriel et non-industriels,
- (ii) aux procédés de séparation de la fraction phénolique des tourteaux de colza et de tournesol avec, comme première partie, l'étude du fractionnement par voie sèche des tourteaux de colza et de tournesol pour la production de fractions enrichies en

protéines et composés phénoliques, et en deuxième partie, la recherche de méthodologies d'extractions des composés phénoliques avec des mélanges hydro-alcooliques,

- (iii) aux traitements enzymatiques des tourteaux de colza et de tournesol, ou de leurs extraits phénoliques, pour la production optimisée d'acides sinapique et caféique
- (iv) et enfin, la synthèse de mono- et di-esters d'acides sinapique et caféique avec des diols aliphatiques, puis l'évaluation de leur capacité antioxydante en milieux homogène et hétérogène.

Finalement, une conclusion générale et quelques perspectives à donner à ces travaux viendront clore ce manuscrit.

CHAPITRE 1 : ETAT DE L'ART

1. FILIERE OLEAGINEUSE ET CONTEXTE GENERAL

Les plantes oléagineuses, telles le colza, le tournesol et le soja, sont cultivées pour la richesse en huile de leurs graines mais aussi pour leurs coproduits, appelés tourteaux, formés après trituration. Les huiles issues de ces plantes oléagineuses sont principalement utilisées en alimentation humaine mais aussi en chimie verte, notamment pour la production de biocarburants, de lubrifiants et d'autres molécules plateforme. Quant aux tourteaux d'oléagineux, ils sont principalement destinés à l'alimentation animale en raison de leur forte teneur en protéines.

Dans le monde, la production d'oléagineux a considérablement augmenté ces dernières années pour répondre à la forte demande en huiles végétales mais aussi en protéines. Les principaux producteurs de graines oléagineuses dans le monde sont les Etats-Unis avec 23% du marché. En 2017, les principales graines oléagineuses produites dans le monde ont été le soja (60%), suivi du colza (12%) et du tournesol (8%) (USDA, 2018).

Au cours des années 1970, l'embargo décrété par les Etats-Unis sur les exportations de soja a contraint exploitants agricoles, industriels et pouvoirs publics français à se doter d'une filière des huiles et protéines végétales. Cette filière est aujourd'hui structurée autour de quatre organismes complémentaires : la FOP (Fédération Française des Producteurs d'Oléagineux et de Protéagineux), Terres Univia (Interprofession des huiles et protéines végétales), Terres Inovia (Institut technique de recherche et développement des professionnels de la filière des huiles protéines végétales et de la filière chanvre) et SOFIPROTEOL (Société de financement et de développement de la filière des huiles et des protéines). L'objectif de cette filière est de réaliser une valorisation concomitante de tous les produits issus des productions oléagineuses, aussi bien l'huile (un tiers est actuellement valorisé en alimentation humaine, et deux tiers en carburant renouvelable) que les tourteaux afin de diminuer la forte dépendance nationale aux protéines de soja.

En 2016, les principaux oléagineux produits dans l'Union Européenne ont été le colza (65%), le tournesol (26%) et le soja (8%). La France est le premier producteur de graines oléagineuses dans l'Union Européenne avec en 2018 : 5,478 Mt de graines de colza, 1,248 Mt de graines de tournesol et 403 Mt de graines de soja (Estimations FranceAgriMer, 2018). Comme le montre la Figure 1, la culture du tournesol est plus développée dans le sud-ouest du pays, alors que celle du colza est présente sur la totalité du territoire et principalement au nord-est.

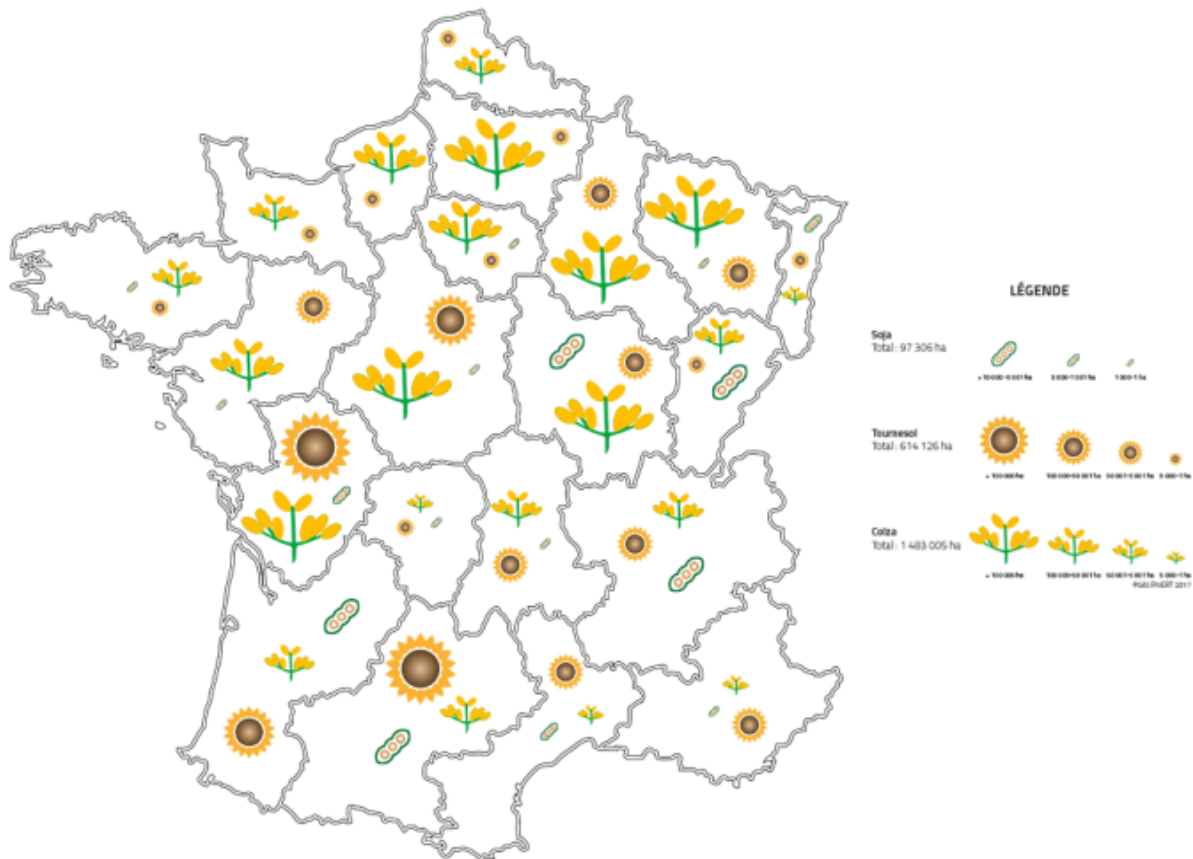


Figure 1 : Distribution géographique des cultures de colza, tournesol et soja en France (source : institut PIVERT, 2018).

2. LE COLZA ET LE TOURNESOL

2.1. UTILISATIONS PRINCIPALES DES GRAINES

Le colza (*Brassica napus L.*) est une plante à fleurs jaune qui fait partie de la famille des Brassicacées (crucifères) et qui est issue du croisement naturel entre un chou (*Brassica oleracea*

L.) et une navette (*Brassica rapa L.*). Connue depuis l'antiquité au travers d'écrits grecs datant de 2000 à 1500 av. J.-C, sa culture et sa commercialisation se sont développées en Europe au milieu du XVI siècle. Le tournesol (*Helianthus annuus*) est une grande plante annuelle à fleur jaune de la famille des Astéracées. Cultivée à l'origine par les indiens d'Amérique du Nord, elle est arrivée en Europe au milieu du XVI siècle. Le colza et le tournesol sont principalement cultivés pour leurs graines riches en huile (43% pour le colza et 44% pour le tournesol). Leur composition chimique est représentée sur les Figures 2-A et 2-B.

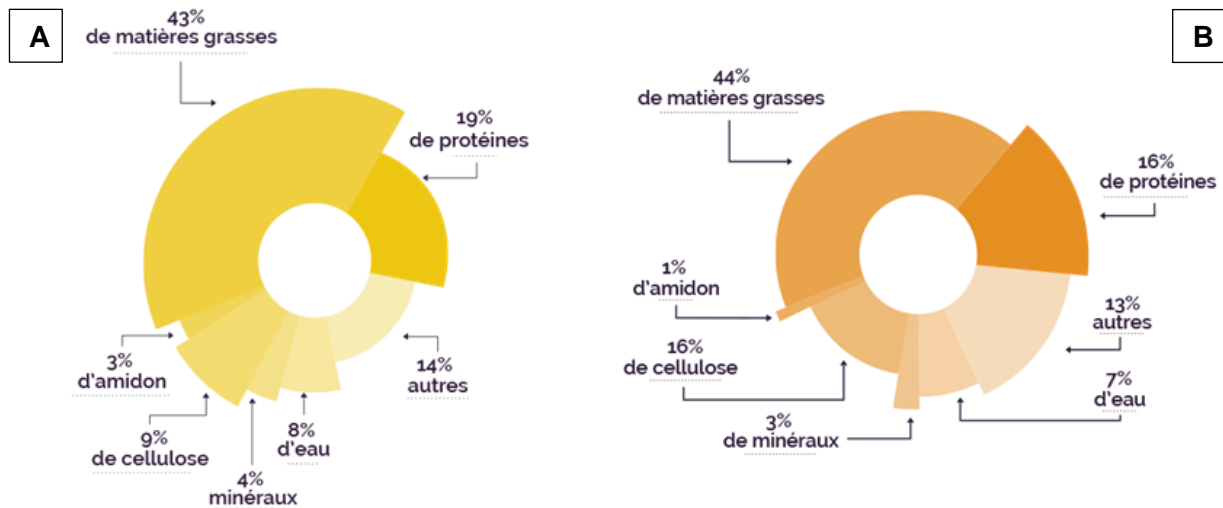


Figure 2 : Composition chimique des graines de colza (A) et de tournesol (B) (source : Terres Univia, 2016).

Depuis plusieurs années, la consommation des huiles contenant des acides gras mono- et polyinsaturés est fortement conseillée dans l'alimentation humaine du fait de leurs qualités nutritionnelles qui contribuent notamment à la diminution des risques cardiovasculaires et des maladies inflammatoires (Ruxton *et al.*, 2004). D'après le Tableau 1, les huiles issues des graines de colza et tournesol sont riches en acides gras mono- et polyinsaturés. Les acides gras majoritaires dans les huiles de colza et de tournesol sont respectivement l'acide oléique (58%, C18:1, ω -9) et l'acide linoléique (67%, C18:2, ω -6). La présence d'autres composés bioactifs tels que des tocophérols et des phytostérols améliorent aussi la qualité nutritionnelle de ces huiles (Siger *et al.*, 2017). De ce fait, elles sont principalement utilisées en alimentation comme huiles de table ou de friture. Néanmoins, ces huiles peuvent être transformées par des procédés chimiques et être utilisées en tant qu'énergie renouvelable (biodiesel) ou encore en

chimie verte pour la production de produits chimiques (glycérine, biolubrifiants, etc.) (Fine *et al.*, 2015). En 2016, 84,6% du biodiesel produit en France a été synthétisé à partir d'huile de colza contre 1,1% à partir d'huile de tournesol (FranceAgriMer, 2018).

	Composition relative (%)				
	C16:0	C18:1 ω-9	C18:2 ω-6	C18:3 ω-3	Autres
Graines de colza	6,0	58,0	22,0	9,0	5,0
Graines de tournesol	6,0	20,0	67,0	0,0	7,0

Tableau 1 : Composition relative (%) en acides gras des huiles des graines de colza et de tournesol (source : Terres Univia, 2016).

2.2. MORPHOLOGIE ET COMPARTIMENTATION DES GRAINES DE COLZA ET DE TOURNESOL

Les graines des plantes, telles que les graines de colza et de tournesol, possèdent des structures très complexes, globalement organisées en trois compartiments : (1) l'embryon, constitué du (ou des) cotylédon(s), de l'hypocotyle et de la radicule, (2) l'endosperme et (3) le tégument qui couvre l'embryon et l'endosperme. De façon plus simplifiée, les graines de colza et de tournesol peuvent être décrites comme une amande (constituées de l'embryon et de l'endosperme) recouverte par un tégument qui lui confère une protection contre les contraintes extérieures. Dans le cas du colza, la graine de morphologie sphérique est constituée d'une amande de couleur jaune claire qui est entourée par un tégument de couleur noire, appelé pellicule (Figure 3-A, 3-D et 3-E). Après maturité des graines, l'endosperme se dégrade et la pellicule enveloppe fermement l'embryon rendant ainsi la séparation de la pellicule et de l'amande très difficile (Hu *et al.*, 2013).

En revanche, la graine de tournesol possède une morphologie ovale et le tégument de couleur noire, nommé coque, recouvre une amande de couleur gris claire (Figure 3-B, 3-F et 3-G). Contrairement à la pellicule de colza, la coque de tournesol est constituée de différentes couches fibreuses qui les séparent de l'embryon (Figure 3-C). Cette caractéristique de la coque de tournesol permet que le décorticage de la graine soit plus facile par rapport au dépelliculage de la graine de colza (Lindström *et al.*, 2007).

Les corps lipidiques (environ 2 µm de diamètre) et les corps protéiques (environ 4 µm de diamètre) sont synthétisés et accumulés dans les amandes de colza et de tournesol (Figure 4). Ces amandes constituent 80-85% du poids de la graine du colza et 75-80% du poids de la graine

de tournesol (Carré *et al.*, 2016; Pedrosa *et al.*, 2000).

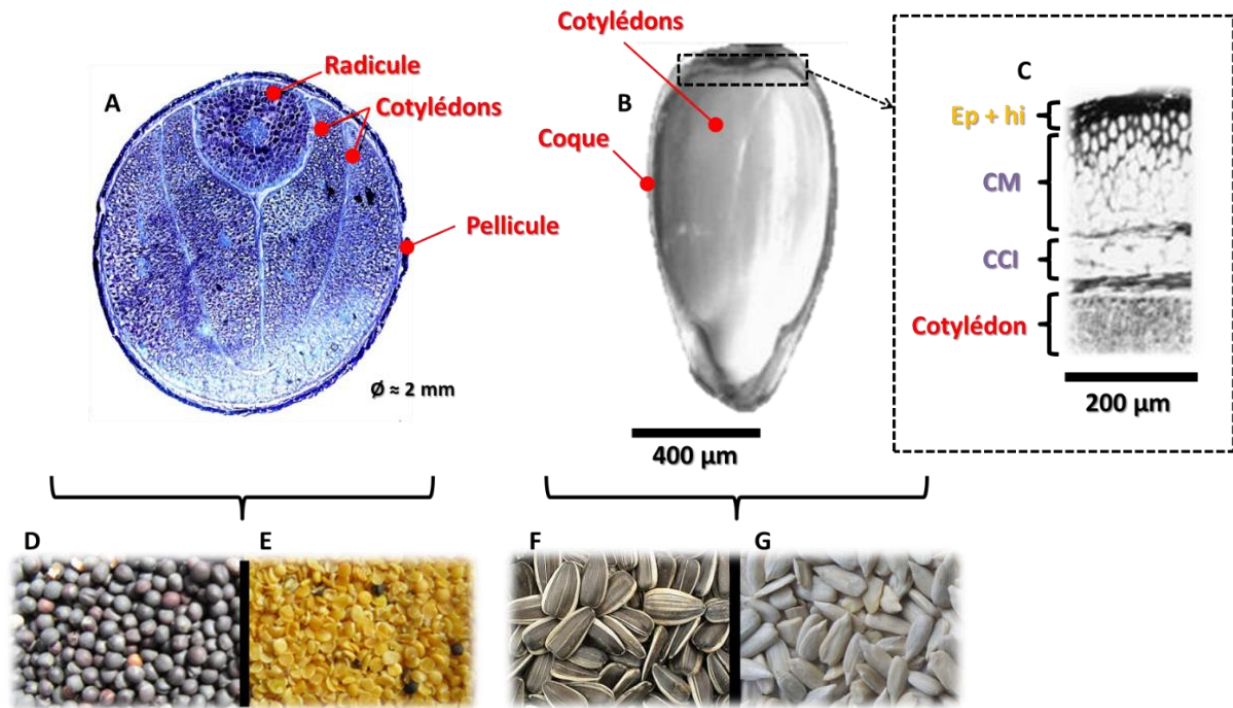


Figure 3 : Morphologie et compartimentation des graines de colza (A), tournesol (B) et coque de tournesol (C) et couleurs des différents constituants des graines : pellicules de colza (D), amandes de colza (E), coques de tournesol (F) et amandes de tournesol (G). Note : Ep : épiderme, hp : hypoderme, CM : couche moyenne, CCI : couche compressée interne. (sources : Hu *et al.*, 2013 et Lindström *et al.*, 2007).

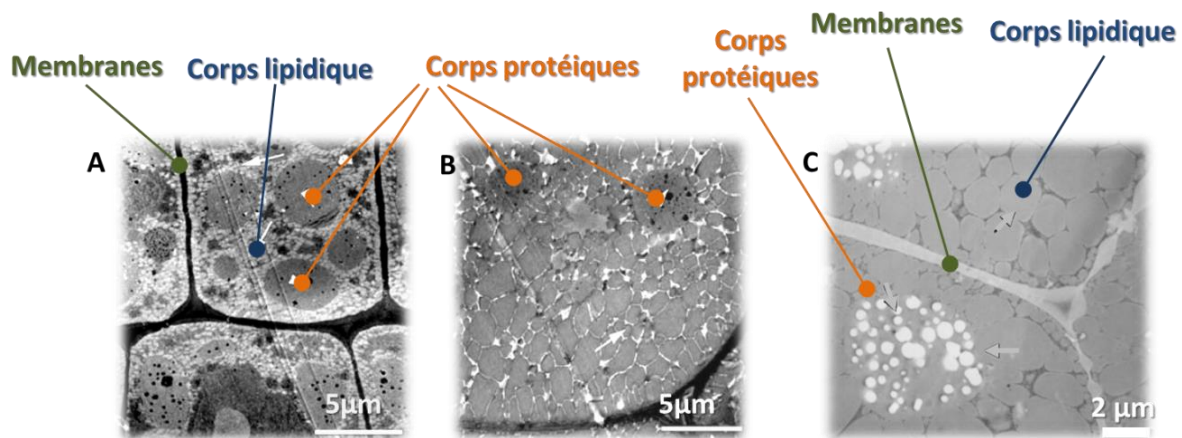


Figure 4 : Corps protéiques, lipidiques et membranes de la racine (A) et du cotylédon (B) de la graine de colza et de l'embryon (C) de la graine de tournesol. [sources : Hu *et al.*, 2013 et Lindström *et al.*, 2007].

2.3. LES TOURTEAUX DE COLZA ET DE TOURNESOL

2.3.1. Les tourteaux comme sources de protéines

Pendant l'année 2016, la France a produit 2,6 Mt et 0,680 Mt de tourteaux de colza et de tournesol respectivement (Terres Univia, 2016). Ce sont des matières premières très hétérogènes, composés de plusieurs familles moléculaires comme le montre la Figure 5.

Les tourteaux ont des concentrations relativement élevées en protéines avec 34% pour le colza (Figure 5-A) et 28% pour le tournesol (Figure 5-B), ce qui justifie leur utilisation en alimentation animale. Dans le cas du tournesol le décorticage de ces graines avant trituration permet d'améliorer leur teneur en protéine (Figure 5-C). Par contre, comme dit précédemment dans la **partie 2.2**, le dépelliculage des graines de colza est très difficile et n'est pas réalisé à l'échelle industrielle car il entraîne une perte considérable de sa fraction lipidique (Carré *et al.*, 2016). Enfin, le tourteau de colza est principalement utilisé pour l'alimentation des ruminants, plus particulièrement des bovins, tandis que le tourteau de tournesol est une matière première plus polyvalente et peut être utilisé pour l'alimentation des ruminants, des porcs et des volailles (source : Terres Univia).

Globalement, les protéines des tourteaux d'oléagineux présentent un profil équilibré en acides aminés essentiels. Dans le cas du colza, les principales protéines de stockage sont les cruciférines et les napines qui représentent 85-90% des protéines totales (Campbell *et al.*, 2016). Les cruciférines sont des globulines 12S riches en glutamine, asparagine et arginine utilisées comme réserves azotées. Cependant, elles ont des teneurs faibles en acides aminés soufrés. A l'inverse les napines sont des protéines riches en albumines 2S, protéines hétérogènes riches en acides aminés soufrés tels la cystéine et la méthionine, mais aussi en acides aminés essentiels comme la lysine (Von Der Haar *et al.*, 2014). Dans le cas du tournesol, les principales protéines de stockage sont des globulines 11S (hélianthinine) et des albumines 2S (SFA) qui représentent environ 90% des protéines totales (González-Pérez and Vereijken, 2007). Les albumines de tournesol sont des protéines riches en acides aminés soufrés mais à faible teneur en acides aminés essentiels, ce qui limite leur qualité nutritionnelle (Weisz *et al.*, 2009).

Outre leur intérêt alimentaire, les protéines oléagineuses, principalement de soja, colza et tournesol, peuvent être transformées en produits à haute valeur ajoutée tels les biomatériaux et les émulsifiants (Shi and Dumont, 2014; Zhang and Mittal, 2010) mais également les adhésifs (Evon *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2014).

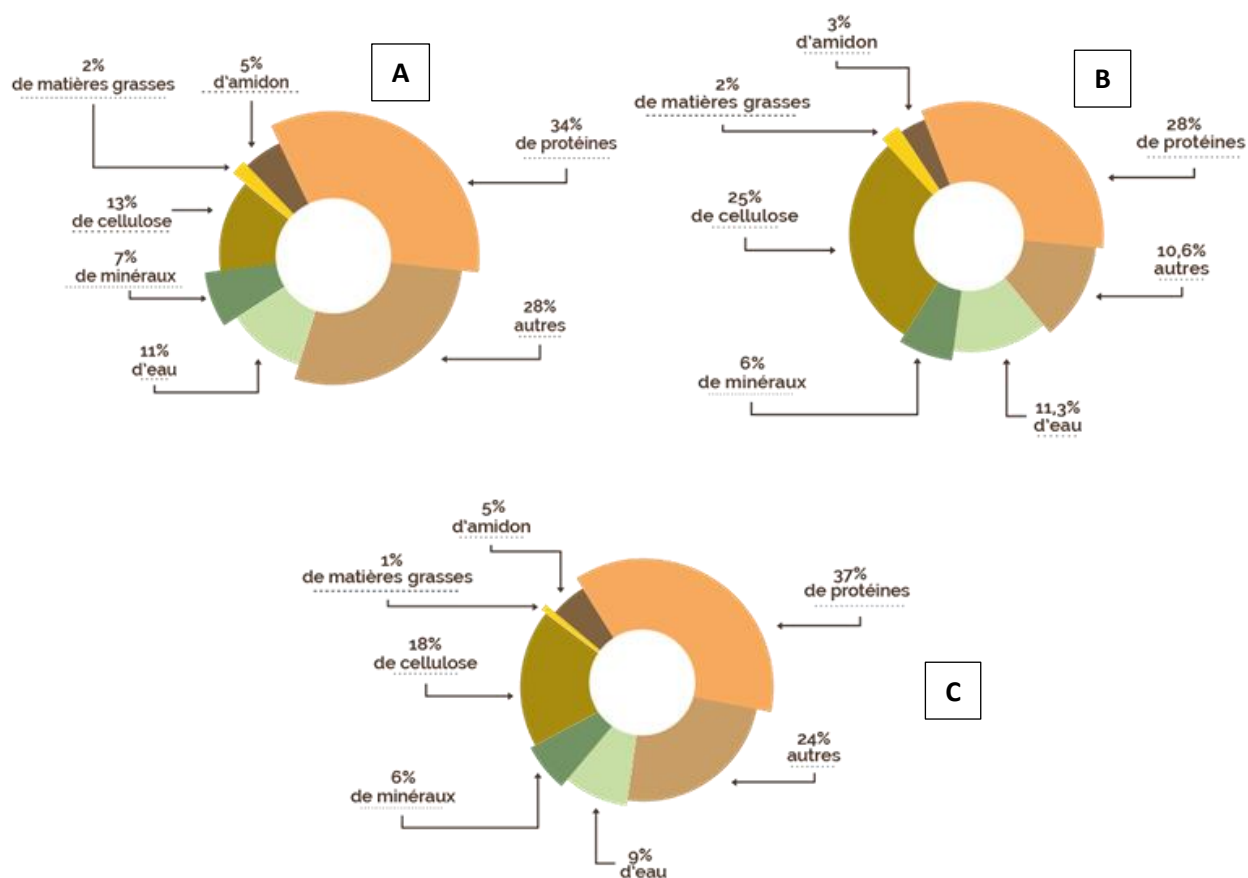


Figure 5 : Composition chimique des tourteaux de colza (A), tournesol (B) et tournesol décortiqué (C). (Source : Terres Univia, 2016).

Par ailleurs, plusieurs études ont démontré l'activité antioxydante des peptides issus des hydrolysats de protéines de tourteaux de colza (Aider and Barbana, 2011; Zhang and Mittal, 2010), tandis que des protéines associées à des composés phénoliques peuvent agir en tant qu'émulsifiant à activité antioxydante (Guimarães Drummond e Silva *et al.*, 2017; Rawel *et al.*, 2005).

2.3.2. Facteurs antinutritionnels des tourteaux de colza et de tournesol

Les tourteaux de colza et de tournesol contiennent divers facteurs indésirables qui diminuent leur qualité nutritionnelle et que nous nous proposons de décrire dans la section suivante.

2.3.2.1. Les fibres

Les teneurs élevées en fibres des tourteaux de colza et de tournesol diminuent leurs valeurs énergétiques. Ces fibres sont des biopolymères à base de cellulose, de polysaccharides non-cellulosiques et de lignine qui entraînent une diminution de la digestibilité des tourteaux (Naczki *et al.*, 1998). Ces fibres étant principalement localisées dans les pellicules de colza et les coques de tournesol, le dépelliculage ou le décortilage des graines peut donc constituer un moyen simple de diminuer la teneur en fibre des tourteaux. Si dans le cas du tournesol, le décortilage des graines est réalisé industriellement, il n'est pas possible pour les graines de colza comme nous l'avons évoqué plus haut en **section 2.2 et 2.3.1.**

2.3.2.2. Les phytates

Les phytates sont des sels de calcium, potassium ou magnésium de l'acide phytique (ou acide myo-inositol (1, 2, 3, 4, 5, 6-hexakis dihydrogène phosphate)) principalement localisés dans les vacuoles de stockage des protéines des graines de colza et de tournesol (Wanasundara *et al.*, 2016, González-Pérez and Vereijken, 2007). Présents dans la plupart des graines, ils sont considérés comme des facteurs antinutritionnels car capables de piéger les minéraux provenant de l'alimentation et susceptibles d'entraîner une diminution de leur biodisponibilité. Ces phytates peuvent aussi former des complexes avec les protéines et altérer leurs fonctionnalités (González-Pérez and Vereijken, 2007; Von Der Haar *et al.*, 2014, p. 130).

2.3.2.3. Les glucosinolates

Dans le cas du colza, les glucosinolates, présents principalement dans les cotylédons et l'embryon de la graine, sont des molécules soufrées contenant une ou plusieurs unités glycosides (thioglycosides) (Wanasundara *et al.*, 2016). Ces glucosinolates et leurs produits de dégradation (thiocyanates, isothiocyanates et nitriles) sont considérés comme toxiques pour les animaux

(Mailer, 2008). Pour palier ce problème la filière s'est tournée vers des variétés de graines à faibles teneurs en glucosinolates ou le traitement thermique (ou aqueux) des graines (Verstraete, 2010). Finalement, les tourteaux de colza doivent avoir une teneur en glucosinolates comprise entre 1 et 15 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ de tourteau pour pouvoir être utilisés en alimentation animale (Tripathi and As, 2017; Verstraete, 2010).

2.3.2.4. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires (voie du shikimate et métabolisme des phénylpropanoïdes), omniprésents dans toutes les plantes, constitués d'au moins un noyau aromatique de type benzène, possédant un ou plusieurs groupements hydroxyles. Ils peuvent avoir des structures simples, comme les acides phénoliques, ou hautement polymérisées dans le cas des tanins condensés (Lin *et al.*, 2016). Une classification sommaire des composés phénoliques est donnée en Figure 6.

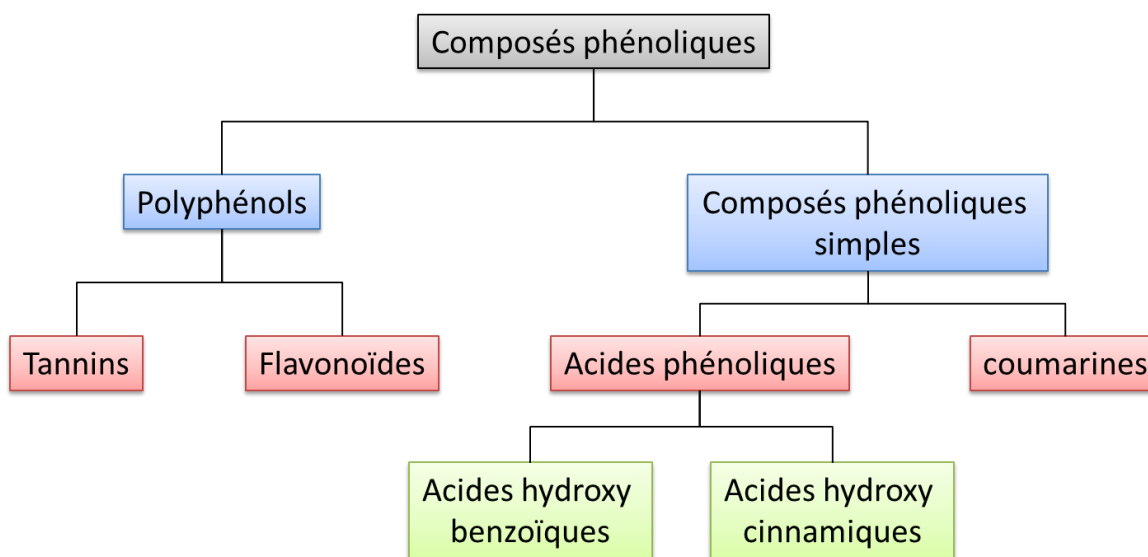


Figure 6 : Classification simplifiée des composés phénoliques.

Dans les plantes, les composés phénoliques sont principalement impliqués dans des mécanismes de défense mais aussi pour accélérer la pollinisation, comme agents de pigmentation ou comme antioxydants ou antimicrobiens (Alasalvar *et al.*, 2001). Dans les tourteaux de colza et de tournesol les teneurs en composés phénoliques représentent respectivement entre 1-2% et 1-4% de leur matière sèche délipidée (MSD). Ils sont principalement localisés dans les amandes mais

également présents en plus faibles quantités, dans les pellicules de colza et les coques de tournesol (Kammerer *et al.*, 2014; Siger *et al.*, 2013). Ils sont responsables du goût d'amertume et de l'astringence lorsqu'ils s'associent aux protéines salivaires.

Par ailleurs, ils peuvent s'oxyder, par voie enzymatique ou en milieu alcalin, et former des o-quinones. Ces produits d'oxydation peuvent ensuite réagir avec les acides aminés des protéines, contenant des fonctions thiols ou amines, et provoquer un brunissement et des modifications de leurs caractéristiques organoleptiques (Ozdal *et al.*, 2013).

2.3.3. Caractérisation fine des composés phénoliques de la graine de colza

La plupart des composés phénoliques présents dans les graines oléagineuses sont des dérivés hydroxylés d'acides benzoïques et cinnamiques, des coumarines, des flavonoïdes, des tannins et des lignines (Ribereau-Gayon, 1972 ; Sosulski, 1979). Dans le colza, deux grandes familles de composés phénoliques peuvent être distinguées : les polyphénols (tannins condensés et flavonoïdes) et les composés phénoliques simples (acides hydroxycinnamiques et leurs esters). Les tannins condensés et les flavonoïdes sont principalement localisés dans les pellicules tandis que les composés phénoliques simples sont plus concentrés dans les amandes (Durkee, 1971; Naczki *et al.*, 2000).

2.3.3.1. Les tannins condensés

Les tannins condensés (appelés aussi proanthocyanidines, PAs) sont des polyphénols complexes formés à partir de dimères ou d'oligomères de divers flavon-3-ols. Ce sont des macromolécules dont le poids moléculaire varie entre 300-500 Da. Différentes études ont été réalisées pour déterminer les teneurs en tannins condensés des tourteaux de colza. Les travaux de Ribereau-Gayon (1972) ont montré que les tannins condensés étaient principalement localisés dans les pellicules de colza, tandis que ceux d'Amarowicz *et al.*, (2000) ont déterminé des teneurs entre 14–2 131 mg/100 g de pellicules, en fonction de la variété de la graine. Néanmoins, les résultats diffèrent d'une étude à l'autre en raison des différences de méthodologies d'extraction et d'analyse (Shahidi, 1990). Les principales sous-unités des tannins condensés présents dans les pellicules de colza sont représentées sur la Figure 7. Leung *et al.* (1979) ont trouvé la

leucocyanidine comme principale sous-unité présente et ils ont émis l'hypothèse que les tannins condensés existaient majoritairement sous forme de polymères de leucocyanidine. Plus récemment, Auger *et al.* (2010) ont montré que les proanthocyanidines présentes dans les pellicules de colza étaient des oligomères de (-)-épicatéchine.

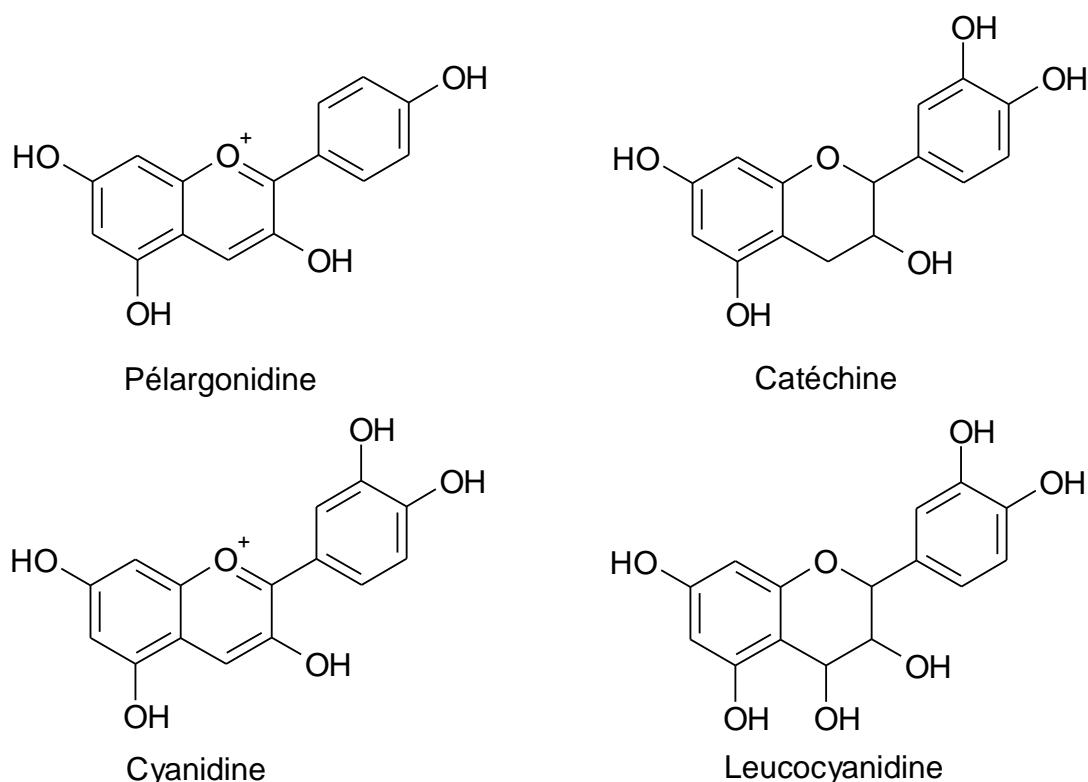


Figure 7 : Les différentes sous-unités des tannins condensés de pellicules de colza.

2.3.3.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent la sous-classe de composés phénoliques la plus répandue du règne végétal. Chimiquement, ils sont formés de deux cycles aromatiques (A et B) reliés par un noyau hétérocyclique de type pyranne (C) comme indiqué sur la Figure 8. Dans les tourteaux de colza, des études ont recensé la présence, en faibles quantités, de différents types de flavonoïdes. Naczka and Shahidi (2004) ont montré la présence de deux flavonoïdes majoritaires dans les tourteaux de colza : le 3-(O-sinapoyl sophoroside)-7-O-glucoside kaempférol et le 3-(O-sinapoyl glucoside)-7-O-sophoroside kaempférol. Plus récemment, Auger *et al.* (2010) ont identifié treize différentes sous-unités flavonoïdes et sept différentes sous-unités flavonols dans les pellicules de colza.

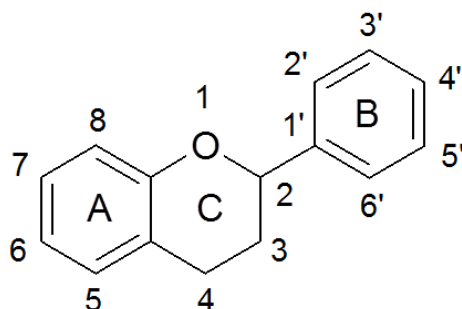
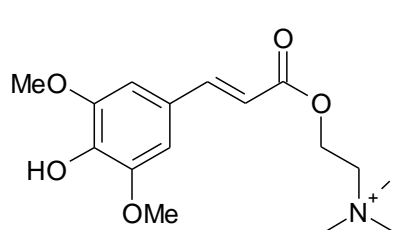


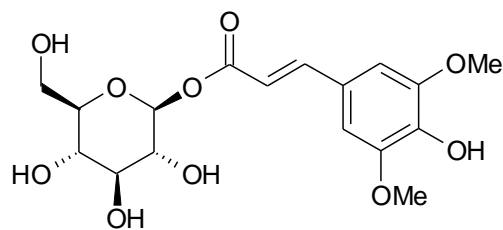
Figure 8: Structure de base des flavonoïdes.

2.3.3.3. Les acides phénoliques et leurs dérivés

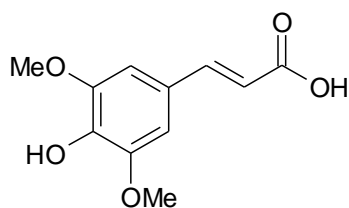
Les dérivés d'acides hydroxycinnamiques sont les composés phénoliques les plus abondants dans le tourteau de colza. Le principal représentant est la sinapoylcholine ou sinapine (2-[[3-(4-hydroxy-3,5-diméthoxyphényl)acryloyl]oxy]-*N,N,N*-triméthylethanaminium, SNP) dont la fonction serait de stocker la choline nécessaire à la biosynthèse de la phosphatidylcholine (Milkowski and Strack, 2010).



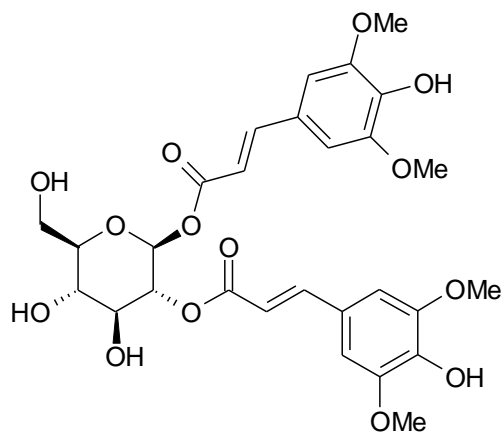
Sinapine



O-sinapoyl-bêta-D-glucose



Acide sinapique



1,2-Di-O-sinapoyl-bêta-D-glucose

Figure 9 : Structure des principaux composés phénoliques de colza.

Cet ester de choline et d'acide sinapique représente environ 80 % (base massique) des composés phénoliques totaux (Naczka *et al.*, 1998), les 20 % restants étant des esters d'acide sinapique (entre 1 à 3 unités sinapoyles) contenant des sucres (glucose, gentiobioside) et/ou du kaempférol (Baumert *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2015). Finalement, l'acide sinapique (acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique, AS) est également présent dans le colza mais il représente, en masse, uniquement 2 % des composés phénoliques totaux. Les structures chimiques de quelques uns des principaux composés phénoliques du tourteau de colza sont représentées sur la Figure 9.

2.3.4. Caractérisation fine des composés phénoliques de graine de tournesol

Comme pour le colza, il existe dans le tournesol deux grandes familles de composés phénoliques qui peuvent être distinguées : les polyphénols de type flavonoïdes et les composés phénoliques simples (acides hydroxycinnamiques et dérivés esters). Les flavonoïdes sont principalement localisés dans la coque tandis que les composés phénoliques simples sont plus concentrés dans l'amande.

2.3.4.1. Les flavonoïdes

Dans les graines de tournesol, des études ont montré la présence de différents types de flavonoïdes en faibles concentrations. Les principaux composés identifiés par Pająk *et al.* (2014) sont la quercétine (0,15 µg/g MS), le kaempférol (0,05 µg/g MS) et l'apigénine (0,29 µg/g MS). Pour leur part, Karamać *et al.* (2012) ont montré la présence de quatre nouveaux dérivés de quercétine en faibles concentrations dans des extraits méthanoliques d'amandes délipidées.

2.3.4.2. Les acides phénoliques et leurs dérivés

Les dérivés d'acides hydroxycinnamiques sont les composés phénoliques les plus abondants dans le tourteau de tournesol. Les structures chimiques de quelques uns des principaux représentants sont visibles sur la Figure 10. Le composé phénolique majoritaire est l'acide 5-caféoylquinique (5-CQA) appelé aussi acide chlorogénique (acide 3-[[3-(3,4-dihydroxyphényl)-1-oxo-2-propenyl]oxy]-1,4,5-trihydroxycyclohexanecarboxylique). C'est un ester d'acide quinique et d'acide caféique (acide (E) 3-(3,4-dihydroxyphényl)prop-2-énoïque, AC) qui représente entre 70-80% (base massique) des composés phénoliques totaux (Guo *et al.*, 2017). A ce jour, le rôle de

l'acide chlorogénique dans le tournesol n'a pas encore été identifié.

D'autres isomères de l'acide chlorogénique (les acides 3- et 4-caféoylquinique, 3-CQA et 4-CQA respectivement) et différents isomères d'acides di-caféoylquiniques sont également présents en quantités non négligeables. Des études ont aussi montré la présence d'acides phénoliques non estérifiés tels que l'acide caféique et l'acide férulique en faibles concentrations, de l'ordre de 0,7 % en masse des composés phénoliques totaux (Guo *et al.*, 2017; Karamac *et al.*, 2012).

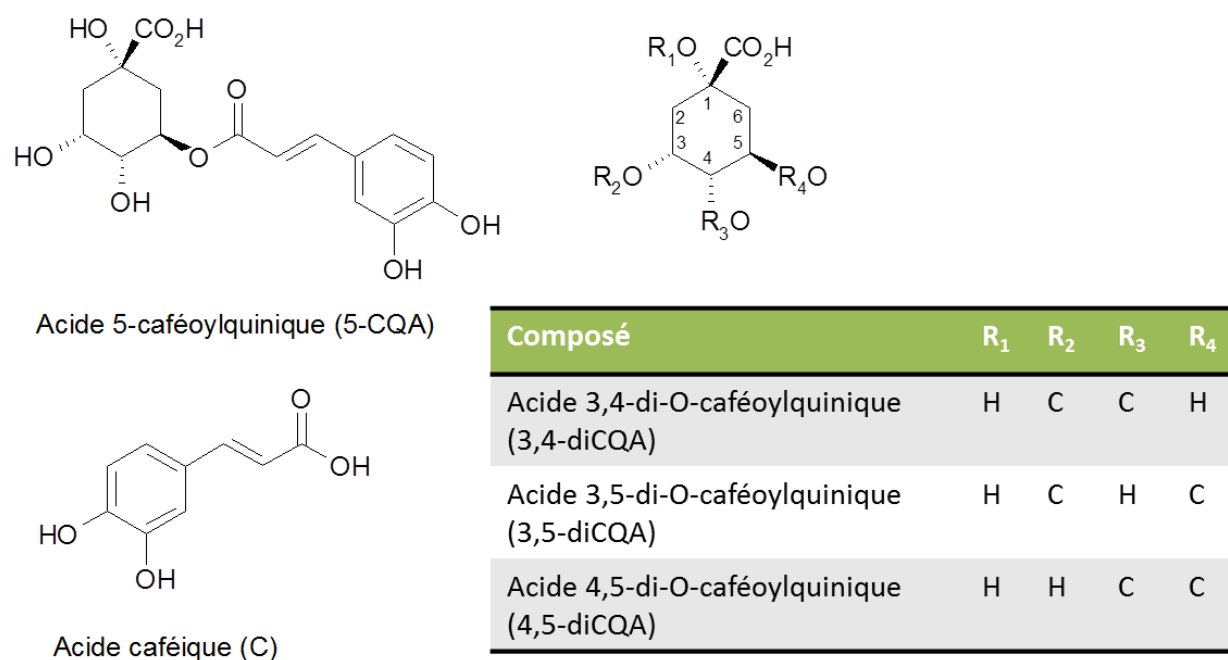


Figure 10 : Structure des principaux composés phénoliques de tournesol.

2.4. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET BIOACTIVES DES COMPOSES PHENOLIQUES

Bien qu'ils aient été longtemps considérés comme des facteurs antinutritionnels, les composés phénoliques apportés par l'alimentation (fruits, légumes, céréales, épices) sont aujourd'hui reconnus comme des éléments importants chez les humains permettant de lutter contre le stress oxydatif responsable de la dégradation des biomolécules essentielles (lipides, glucides, protéines et acides nucléiques) et associés à de nombreuses pathologies comme le cancer, le diabète ou les maladies cardiovasculaires. En effet, grâce à leurs propriétés antioxydantes induites par la présence par de(s) cycle(s) phénolique(s) ils sont un appui précieux aux systèmes de défenses enzymatiques endogènes en participant, par différents mécanismes, au piégeage des radicaux

libres, à la chélation des métaux ou encore à l'inhibition d'enzymes pro-oxydantes. En outre, ils possèdent d'autres propriétés physico-chimiques (anti-UV) ou biologiques (vasodilatatrices, anti-allergéniques, anti-inflammatoires, anti-atherogénique, anti-thrombotique, antimicrobienne) qui contribuent à leur effet protecteur global (Shahidi and Ambigaipalan, 2015). Dans cette partie, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires des composés phénoliques que nous nous proposons de passer en revue.

2.4.1. Propriétés antioxydantes et antiradicalaires

Les propriétés antioxydantes et antiradicalaires de ces composés sont dues à la présence d'un ou plusieurs groupements hydroxyle sur leur(s) cycle(s) aromatique(s). Elles résultent de divers mécanismes d'action, les plus importants étant la réduction des radicaux libres par transfert d'atomes d'hydrogène à partir des hydroxyles phénoliques ou par don d'électron de ces derniers lorsqu'ils se trouvent sous forme phénolate en conditions de pH élevé. Cette réactivité des hydroxyles phénoliques dépend de la présence ou non de structures permettant une délocalisation des électrons par effets mésomères et la stabilisation ultérieure du radical phénoxy (Laguerre *et al.*, 2013). C'est le cas des acides hydroxycinnamiques, tels que l'acide sinapique et l'acide caféique, qui possèdent une double liaison entre leur cycle aromatique et leur groupement acide carboxylique (acides α,β -insaturés), et dont quelques exemples sont présentés sur la Figure 11.

D'autres mécanismes mineurs peuvent être cités, comme la chélation des métaux de transition par les acides phénoliques et les flavonoïdes ou la désactivation de l'oxygène singulet ^1O par les tocophérols (Khokhar and Owusu Apenten, 2003; Laguerre *et al.*, 2007; Rice-Evans *et al.*, 1996). Notons par ailleurs que les composés phénoliques peuvent, d'une part, constituer une seconde ligne de défense en « neutralisant » les composés carbonylés produits durant l'oxydation et, d'autre part, exprimer eux-mêmes une activité pro-oxydante (Chedea *et al.*, 2012; Halliwell, 2008; Masuda *et al.*, 2013). Enfin, les produits d'oxydation des composés phénoliques étant rarement inertes chimiquement ils pourront avoir, suivant les circonstances, une activité antioxydante ou pro-oxydante. Il faut donc considérer l'activité antioxydante globale d'une molécule comme la résultante d'une combinaison de mécanismes, dont l'expression dépendra de la réactivité

intrinsèque de la molécule, de son environnement et du devenir des espèces oxydées auxquelles elle aura donné naissance.

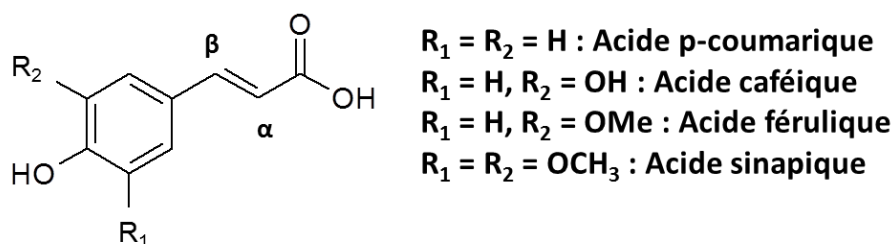


Figure 11 : Structures des acides hydroxycinnamiques.

Cas des composés phénoliques de colza et de tournesol

Szydłowska-Czerniak *et al.* (2011) ont étudié les propriétés antioxydantes des composés phénoliques présents dans des tourteaux de colza issus de vingt-neuf variétés de graines. Dans cette étude, les composés phénoliques ont été extraits des différents tourteaux avec du méthanol pur. Puis, les teneurs en composés phénoliques totaux (CPT) des différents extraits méthanoliques, comprises entre 756-1324 mg d'équivalents d'acide sinapique (EAS)/100 g MS, ont été déterminées par la méthode spectrophotométrique de Folin-Ciocalteu (F-C). La capacité antiradicalaire des différents extraits, déterminée par la méthode DPPH[•], a été de 3194-6346 μ mol d'équivalent Trolox (éq. Trolox)/100 g MS. Finalement, les auteurs ont montré qu'il existait une corrélation entre la teneur en CPT et la capacité antiradicalaire des extraits phénoliques, les extraits contenant la concentration la plus élevée en CPT ayant l'activité la plus forte.

De même, Siger *et al.* (2013) ont déterminé la capacité antioxydante d'extraits phénoliques de deux tourteaux de colza (issus de deux variétés de graines différentes), avant et après hydrolyse basique ou acide. Pour commencer, les composés phénoliques des différents tourteaux ont été extraits avec du méthanol pur et ces extraits ont ensuite été hydrolysés en milieu basique (NaOH 4M, température ambiante) ou en milieu acide (HCl 1,1M, 90°C).

Avant les étapes d'hydrolyse, les auteurs indiquent que le composé majoritaire des extraits est la sinapine, sans pour autant en préciser la concentration.

Après l'hydrolyse basique, les composés phénoliques majoritaires identifiés par HPLC-MS et quantifiés par HPLC-UV étaient l'acide *cis*-sinapique (121,5-125,1 mg/100 g MS), l'acide *trans*-sinapique (836,3-655,9 mg/100 g MS) et le sinapate de méthyl (2702,0-2533,0 mg d'EAS/100 g MS). En revanche, l'analyse par HPLC-MS après l'hydrolyse acide de l'extrait a permis d'identifier quinze composés phénoliques différents, l'acide *cis*-sinapique (93,2-89,3 mg/100 g MS), l'acide *trans*-sinapique (736,6-551,7 mg/100 g MS) et la sinapine (1085,0-1398,4 mg d'EAS/100 g MS) étant les composés majoritaires. Ensuite, les capacités antioxydantes des différents extraits (avant et après hydrolyse) ont été déterminées par la méthode TRAP (total peroxy radical-trapping potential). Une amélioration de la capacité antioxydante de 222-310% et de 244-360% a été observée respectivement pour les extraits hydrolysés en milieu basique et en milieu acide. Les auteurs expliquent que l'amélioration du pouvoir antioxydant des extraits hydrolysés viendrait de la libération des deux isomères d'acide sinapique qui auraient probablement des capacités antioxydantes plus importantes que leurs formes estérifiées.

De leur côté, Karamać *et al.* (2012) ont mis en évidence la capacité antioxydante de différents composés phénoliques présents dans un tourteau décortiqué de tournesol. Ils ont d'abord obtenu un extrait phénolique brut par extraction du tourteau avec une solution MeOH/H₂O 80% (v/v), puis isolé six fractions (I-VI) de l'extrait par chromatographie sur colonne Sephadex LH-120. Les différentes fractions obtenues ont été caractérisées en termes de composés phénoliques individuels par HPLC-MS et de teneurs en CPT par la méthode de F-C. Puis, les capacités antioxydantes des différentes fractions ont été déterminées par les méthodes spectrophotométriques de DPPH• et d'ABTS.

Les résultats ont mis en évidence que les fractions ayant les teneurs les plus importantes en CPT étaient les suivantes : V (666 mg d'équivalents d'acide chlorogénique (EAC)/g MS) > IV (645 mg d'EAC/g MS) > (511 mg d'EAC/g MS). Le principal composé phénolique déterminé dans les fractions IV et V a été l'acide 5-caféoylquinique (236,3 mg/g MS et 308,9 mg/g MS respectivement) et les composés phénoliques majoritaires de la fraction VI ont été identifiés comme étant des isomères d'acides di-caféoylquiniques (concentration de tous les isomères de 143,7 mg d'EAC/g MS).

Finalement, les auteurs ont montré que la fraction ayant la capacité antioxydante la plus importante d'après les tests de DPPH• et d'ABTS était la fraction V (EC₅₀ de 0,025 mg d'extrait pour le DPPH• et 2,21 mmol équivalents Trolox (éq. Trolox)/g d'extrait pour l'ABTS) suivie de la fraction VI (EC₅₀ de 0,024 mg d'extrait pour le DPPH• et 1,5 mmol éq. Trolox/g d'extrait pour l'ABTS). Ainsi, les capacités antioxydantes de l'acide 5-caféoylquinique mais aussi des différents isomères d'acides di-caféoylquiniques ont pu être mises en évidence.

En outre, l'étude réalisée par De Leonardis *et al.* (2005) a permis de montrer la faisabilité d'employer des coques de tournesol comme source d'antioxydants naturels. Dans cette étude, l'extraction des composés phénoliques présents dans des coques de tournesol partiellement délipidés (CTPD) a été réalisée à différents pH (5, 7 et 9) avec différents mélanges hydro-alcooliques (éthanol, méthanol et acétone) à 25°C. La teneur en CPT de chaque extrait hydro-alcoolique aux différents pH a été déterminée par la méthode de F-C et les composés phénoliques individuels ont été identifiés par HPLC-UV.

Les auteurs ont mis en évidence que le composé phénolique majoritaire dans les différents extraits de CTPD était l'acide 5-caféoylquinique, représentant dans tous les cas environs 80% des CPT en masse. Par ailleurs, les solvants qui ont conduit aux meilleurs rendements de récupération des CPT ont été les mélanges éthanol/eau 60:40 (v/v) (1,05 mg/mL) et acétone/eau 60:40 (1,15 mg/mL) à pH 5. L'éthanol étant moins toxique que l'acétone, le mélange éthanol/eau 60:40 a été choisi comme solvant de référence pour le reste de l'étude. Puis, l'extrait issu du mélange éthanol/eau à pH 5 a été hydrolysé avec une solution NaOH 1,25 M pour la production d'acide caféique. Après hydrolyse de l'extrait, tout l'acide chlorogénique initialement présent dans l'extrait (0,015 mmol/mL) a été hydrolysé en acide caféique (0,014 mmol/mL) après 60 min d'incubation. Finalement, la capacité antioxydante de l'acide caféique issu des CTPD a été déterminée par la méthode Rancimat (vieillesse accélérée à 130°C) en mesurant l'apparition des produits secondaires d'oxydation des huiles d'olive et de tournesol en présence et absence d'acide caféique. A la fin de cette expérience, l'acide caféique a permis de retarder l'apparition de produits secondaires d'oxydation et il a été plus efficace à lutter contre l'oxydation lipidique dans l'huile de tournesol par rapport à l'huile d'olive.

2.4.2. Application des composés phénoliques à la maîtrise de l'oxydation lipidique.

Les phénomènes d'oxydation constituent l'une des causes majeures de l'altération des produits alimentaires ou cosmétiques. Ces phénomènes qui concernent en premier lieu les lipides (poly)insaturés ont un impact direct sur les qualités fonctionnelles (altération de la texture), nutritionnelles (dégradation des vitamines et des acides gras ω -3) et organoleptiques (développement d'odeurs et de goût de rance) des produits. En outre, la production de composés nocifs indésirables (radicaux libres, hydroperoxydes, époxydes, dialdéhydes) au cours de l'oxydation, réduit la durée de vie des produits et constitue un danger potentiel pour les consommateurs (Alamed *et al.*, 2009; Waraho *et al.*, 2011).

Pour faire face à ce problème, l'industrie dispose de nombreux moyens de lutte au travers d'une multitude de conservateurs, et tout particulièrement de composés phénoliques. Néanmoins, il s'agit le plus souvent d'antioxydants d'origine synthétique tels le BHT (2,6-di-tertiobutyl-4-méthylphénol), le BHA (2- et 3-tertiobutyl-4-hydroxyanisole), le BTHQ (2-tert-butylhydroquinone) et les parabènes (*p*-hydroxybenzoates d'alkyles), dont les effets néfastes sur la santé sont suspectés ou avérés et dont le rejet par les consommateurs est chaque jour plus important.

Dans ce contexte, la mise en œuvre d'antioxydants phénoliques naturels (sous forme pure ou d'extrait) est devenue un enjeu majeur pour la recherche et l'industrie car, au-delà de la réponse technologique apportée au problème d'oxydation, elle peut contribuer à la valorisation de nombreuses ressources végétales, inexploitées pour certaines.

Concernant ce dernier point, des études ont montré que l'utilisation de certaines herbes et épices permettaient de retarder de façon efficace le développement de la rancidité des huiles exposées à des conditions de peroxydation lipidique. En effet, les extraits naturels issus de ces herbes et épices possèdent des effets antioxydants attribués essentiellement à la présence des composés phénoliques et plus particulièrement aux acides phénoliques et aux flavonoïdes. Par exemple, l'extrait naturel de romarin, riche en acide carnosique, carnosol et acide rosmarinique, est plus efficace pour la protection d'acides gras de plusieurs matrices alimentaires par rapport à certains antioxydants synthétiques, tels que le BHA et le BHT (Kiokias *et al.*, 2008).

Cependant, à l'exception des tocophérols et tocotriénols (Vitamine E) ainsi que quelques familles de composés naturellement lipophiles comme les alkylrésorcinols, la plupart des composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes, stilbènes, diterpènes...) présente une polarité relativement élevée qui peut se traduire par une moindre efficacité dans les systèmes lipidiques dispersés comme les émulsions, les solutions micellaires ou les suspensions de liposomes (Laguerre *et al.*, 2007 ; Lopez-Giraldo *et al.*, 2007). En effet, dans de tels systèmes, les composés phénoliques polaires tendent à se concentrer dans la phase aqueuse au détriment de l'interface huile/eau où se produit l'oxydation des lipides insaturés. Aussi la lipophilisation, qui consiste à greffer de façon covalente une chaîne lipidique, a-t-elle été envisagée pour modifier les propriétés tensio-actives des composés phénoliques et améliorer leur action antioxydante en systèmes lipidiques complexes. Mais cette stratégie est-elle efficace et, si oui, quels sont les mécanismes d'action à l'origine de cette efficacité améliorée ? Pour le savoir, nous invitons le lecteur à se reporter au **chapitre 6.2** consacré à la lipophilisation des acides phénoliques et l'étude des effets de cette modification sur l'activité antioxydante dans divers milieux lipidiques.

3. FRACTIONNEMENT PAR VOIE SECHE DE LA BIOMASSE

La perspective d'une population mondiale de 9 milliards d'individus d'ici 2050, combinée à la raréfaction des ressources fossiles et la nécessité absolue de réduire notre empreinte carbone sur l'environnement, impose aujourd'hui de repenser totalement un modèle économique de développement basé sur le « tout pétrole ». Face à ce défi majeur, la « bioéconomie » a pour ambition de développer de nouveaux systèmes durables intégrés permettant de répondre à la fois aux besoins alimentaires, et de l'ensemble des secteurs de l'industrie. Elle se base sur la bioraffinerie qui peut être définie comme la conversion totale de la biomasse (animale, végétale ou microbienne) en énergie (biocarburant, électricité, etc.) et en produits destinés à l'alimentation, la construction, la santé ou encore la chimie (Cherubini, 2010). De ce fait, les produits et coproduits de la filière des oléagineux constituent des matières premières parfaitement adaptées au concept de valorisation totale mis en œuvre dans les bioraffineries, au regard de leur composition variée en lipides, protéines, polysaccharides, lignocellulose, ou autres composés mineurs d'intérêt (schéma 1).

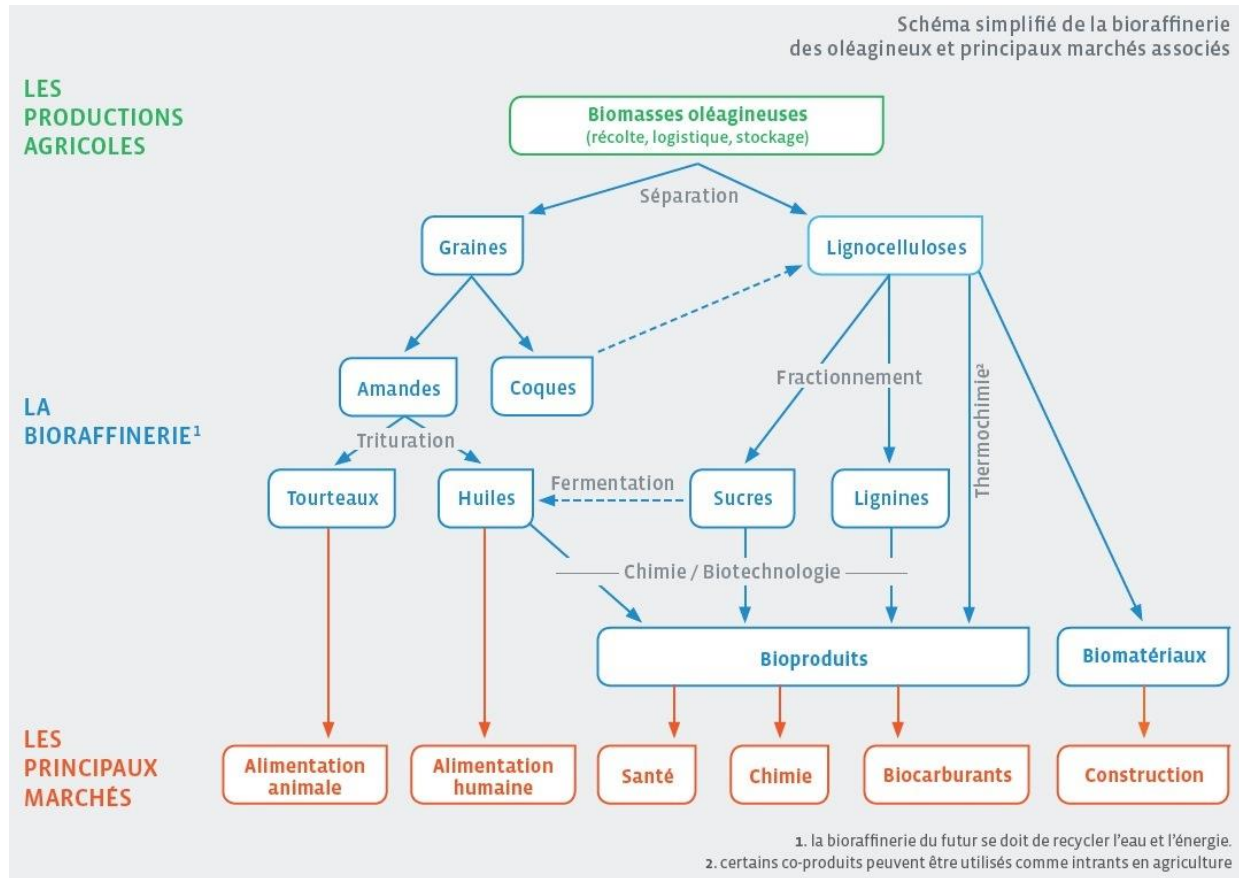


Schéma 1 : Schéma simplifié de la bioraffinerie des oléagineux et principaux marchés associés (source : institut PIVERT, 2014).

De nos jours, la plupart des procédés utilisés pour séparer les différents composants des tourteaux oléagineux, ainsi que d'autres produits issus de l'industrie agroalimentaire, sont basés sur des traitements chimiques en phase liquide. Par exemple, l'extraction des protéines de soja est basée sur des traitements alcalins qui permettent de solubiliser les protéines avant de les concentrer sous forme d'isolat protéique (Preece *et al.*, 2017). Cependant, ces types de procédés sont coûteux en énergie et en réactifs (solvants, bases alcalines), consomment beaucoup d'eau, génèrent des effluents (sels de métaux alcalins) et détériorent les autres composants des matières premières traitées (Barakat and Rouau, 2014). En outre, ces traitements sont souvent inefficaces pour séparer individuellement la totalité des constituants d'une matière première.

Le fractionnement par voie sèche représente aujourd'hui une alternative prometteuse aux procédés assistés par solvants. Développé récemment, il a été utilisé pour la séparation des différents constituants de diverses matières premières agricoles, telles que des céréales (Barakat

et al., 2014; Chuetor *et al.*, 2015; Hemery *et al.*, 2011; Pascale J. M. Pelgrom *et al.*, 2014; Schutyser *et al.*, 2015), ou des tourteaux oléagineux (Barakat *et al.*, 2015; Basset *et al.*, 2016). Le fractionnement par voie sèche peut être divisé en deux étapes, la première correspondant au broyage de la matière première et la deuxième à sa séparation en différentes fractions.

3.1. ETAPE DE BROyage

Cette étape a pour but de dissocier les différents constituants des matrices cellulaires en fonction de leurs propriétés mécaniques et physiques. Le broyage diminue la taille moyenne des particules (D_{50}) et augmente la surface spécifique (Barakat *et al.*, 2013; Galbe and Zacchi, 2012). Actuellement, Il existe plusieurs technologies de broyage basées sur différents types de contraintes mécaniques : impact, cisaillement, friction, et compression (Figure 12), certains équipements permettant de combiner plusieurs de ces contraintes (Barakat *et al.*, 2014).

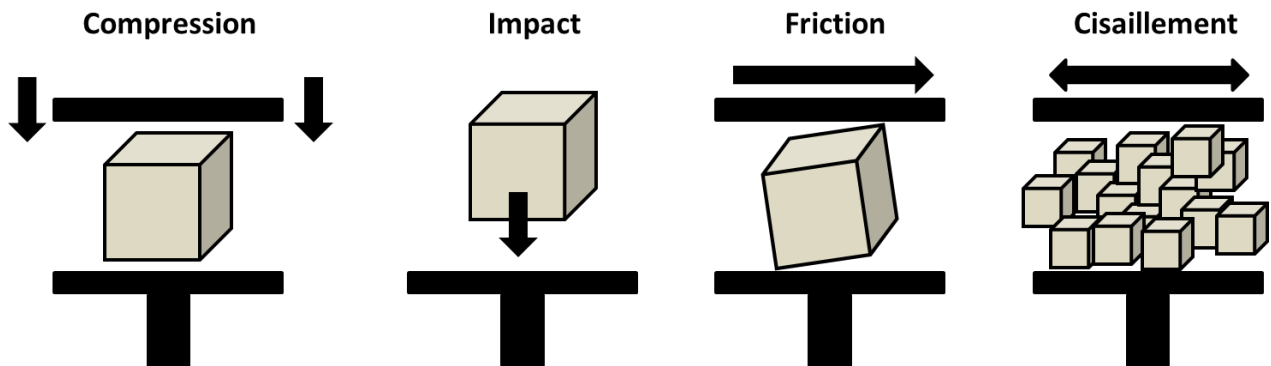


Figure 12 : Quelques exemples de contraintes mécaniques (Barakat *et al.*, 2014).

L'étape de broyage doit permettre de dissocier les différents composants de la matière première sans les endommager (Schutyser and van der Goot, 2011). Par exemple, Pelgrom *et al.* (2013) ont étudié le fractionnement par voie sèche de graines de pois pour la production de fractions enrichies en protéines. Dans cette étude, les graines ont été broyées soit par impact seul avec un appareil de type A ZPS50 impact mill, soit par impact et friction avec un appareil de type AFG100 fluidized-bed jet mill. Pour ces deux broyeurs équipés d'un rotor de tri, les vitesses de rotations ont été fixées à 2500, 4000 et 8000 tpm. Les résultats obtenus dans cette étude sont regroupés dans le Tableau 2.

Vitesse de classification (tpm)	Rendement % (m/m)	D ₅₀ (µm)	Protéines (% MS)	Amidon fracturé (% d'amidon)
Impact et friction				
2500	75,0 ± 1,0	15,8 ± 0,1	22,5 ± 0,3	2,3 ± 0,0
4000	73,3 ± 0,2	12,9 ± 0,8	23,3 ± 1,9	3,4 ± 0,2
8000	39,9 ± 2,1	6,1 ± 0,2	32,7 ± 2,0	20,7 ± 1,6
Impact				
2500	86,5 ± 1,9	19,3 ± 0,8	22,4 ± 0,8	2,5 ± 0,2
4000	72,8 ± 2,3	18,0 ± 0,5	24,3 ± 0,9	3,2 ± 0,5
8000	15,5 ± 0,5	8,0 ± 0,1	55,4 ± 1,8	2,4 ± 0,0

Tableau 2 : Résultats obtenus après broyage des graines de pois utilisant un broyage à impact ou impact et friction, à différentes vitesses du rotor de tri. Les teneurs en protéines sont exprimées en pourcentage de matière sèche (%MS). (Pelgrom *et al.*, 2013).

Dans les deux cas, les corps protéiques des graines de pois ont été détachés après broyage et l'augmentation des vitesses de rotation a conduit à une diminution de la D₅₀ et du rendement global de récupération. En revanche, une augmentation de la teneur en protéines a été observée avec l'augmentation des vitesses de rotation indiquant ainsi un phénomène de pré-tri pendant l'étape de broyage.

Or, les auteurs expliquent que cette étape de pré-tri n'est pas très efficace du fait de la forte diminution des rendements de récupération avec l'augmentation des vitesses de rotation. Finalement, les auteurs ont observé que le pourcentage de particules d'amidon fracturé était relativement constant sauf lorsque le broyage était réalisé par impact et friction à 8000 tpm (20,7%). Ils expliquent que probablement à cette vitesse, le broyage à impact et friction est plus puissant que le broyage à impact seul, conduisant à une fracturation des granules d'amidon en fines particules.

D'autres études ont également montré qu'un broyage trop intense pouvait conduire à une réduction des rendements de récupération quand les particules de trop faible taille s'agglomèrent sur les parois internes des broyeurs par des interactions de type Van der Waals (Pascalle J.M. Pelgrom *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016). De même, les matières premières contenant de fortes teneurs en lipides sont susceptibles de les libérer pendant le broyage et d'entraîner des phénomènes d'agglomération des particules.

3.2. ETAPE DE SÉPARATION

Après dissociation, les constituants sont séparés en fonction de leurs propriétés physico-chimiques et de la technique employée. Les principales techniques de séparation par voie sèche sont le tri électrostatique, la turbo séparation et le tamisage. Dans cette étude bibliographique, nous nous sommes focalisés sur le tri électrostatique et la turbo séparation.

3.2.1. Tri électrostatique

Le tri électrostatique permet de séparer les différentes particules en fonction de leurs charges partielles. Avant séparation, les particules sont entraînées dans un tube nommé ligne de charge où elles sont chargées par triboélectricité, c'est-à-dire par frottements entre elles ou contre les parois de la ligne de charge. Les particules chargées sont ensuite entraînées dans une chambre contenant deux électrodes, l'une positive et l'autre négative. Les particules chargées négativement sont attirées par l'électrode positive et, inversement, les particules chargées positivement sont attirées par l'électrode négative. Un schéma simplifié du principe de tri électrostatique peut être observé sur le schéma 2.

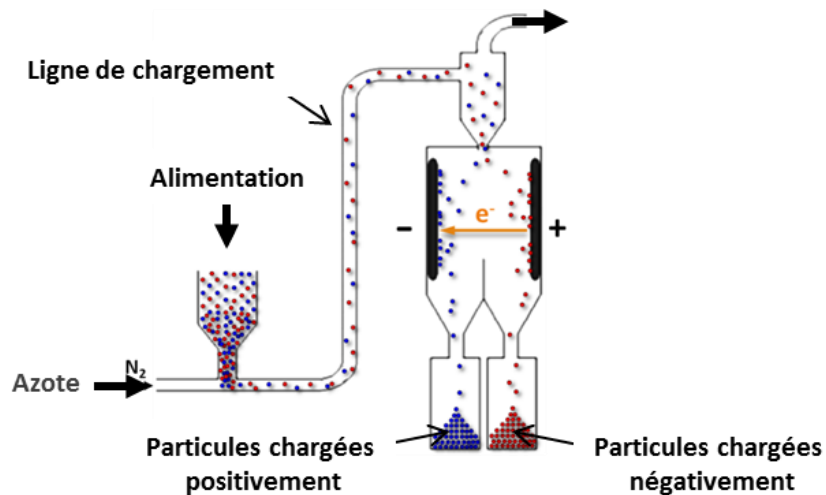


Schéma 2 : Principe du tri électrostatique.

Hemery *et al.* (2011) ont utilisé cette technique pour séparer les différentes couches constitutives du son de blé. Dans cette étude, le son de blé a été finement broyé, soit en réalisant une

combinaison d'impact et de cisaillement avec un appareil de type impact mill UPZ 100 à température ambiante, soit en réalisant un broyage cryogénique à -100°C avec un broyeur à marteau. Dans les deux cas, après séparation électrostatique, les auteurs ont montré que les fractions positives avaient une couleur « claire » et qu'elles étaient enrichies avec la partie aleurone tandis que les fractions négatives avaient une couleur plus « sombre » et qu'elles étaient enrichies en péricarpe. Ainsi, ils ont démontré qu'après broyage, les tissus de l'aleurone (riche en protéines) et du péricarpe (riche en lignocellulose) étaient plus exposés et que la composition chimique de leurs particules de surface influençait leur comportement de charge. Cette capacité à se charger provient de la capacité des macromolécules de surfaces à capter ou céder des électrons. Par exemple, les protéines sont des macromolécules contenant des groupements N-terminaux, C-terminaux et des chaînes latérales susceptible de se charger (Jafari *et al.*, 2016), cette charge étant généralement positive. Par contre, la cellulose et la lignine ont davantage tendance à se charger négativement (Lammi *et al.*, 2018).

Ce phénomène a également été observé lors du tri électrostatique de tourteaux de colza et de tournesol (Barakat *et al.*, 2015; Basset *et al.*, 2016). Dans les deux cas, les tourteaux ont été finement broyés en utilisant un broyeur à impact de type impact mill Retsch ZM 200 à température ambiante avec une vitesse de rotation du broyeur de 12 000 tpm. Après broyage, les tourteaux ont été séparés par tri électrostatique et les caractéristiques physico-chimiques des différentes fractions obtenues peuvent être visualisées dans le Tableau 3. Dans les deux cas, ce procédé de séparation a permis de récupérer des fractions chargées positivement de couleur « claire » et riches en protéines et d'autres, chargées négativement de couleur « sombre », et enrichies en lignine.

Matière première	Fraction	Rendement (% m/m)	D ₅₀ (µm)	Couleur	Protéines (%)	Lignine (%)	Réf.
Tourteau de colza	Fraction initiale	--	90	--	37	16	Basset <i>et al.</i> , 2016
	Fraction positive	61	75	Jaune claire	47	8	
	Fraction négative	39	115	Noire	25	27	
Tourteau de tournesol	Fraction initiale	--	70	--	31	21	Barakat <i>et al.</i> , 2015
	Fraction positive	59	24	Gris claire	48	7,5	
	Fraction négative	41	77	Noire	5	39	

Tableau 3 : Séparation électrostatique des tourteaux de colza et de tournesol réalisée par Barakat *et al.* (2015) et Basset *et al.* (2016).

Pour le colza, le gain en protéines dans la fraction positive a été de 27% tandis que pour le tournesol le gain a été environ deux fois supérieur, de l'ordre de 55%. En revanche, la fraction négative du colza a été enrichie de 69% en lignine tandis que la fraction négative du tournesol a été enrichie de 85%.

Dans les deux cas, les valeurs de D_{50} ont été plus faibles dans les fractions positives comparées aux valeurs obtenues dans les fractions négatives. Ainsi, les auteurs ont pu mettre en évidence la capacité des corps protéiques de petites tailles des tourteaux de colza et de tournesol à se charger positivement tandis que les grosses particules riches en lignine avaient plus tendance à se charger négativement.

Cependant, le problème majeur de cette méthode de séparation est le faible rendement de récupération massique (% m/m) des fractions d'intérêt (enrichie en protéines ou en lignines). Pour pallier cet inconvénient, lors du tri électrostatique de poudres de graines de lupin, Wang *et al.* (2016) ont proposé de réaliser des étapes de recyclage afin d'améliorer les rendements de récupération de la fraction d'intérêt, c'est-à-dire, de la fraction positive de l'électrode (FPe) enrichie en protéines. Le procédé de recyclage réalisé dans cette étude peut être observé sur la Figure 13.

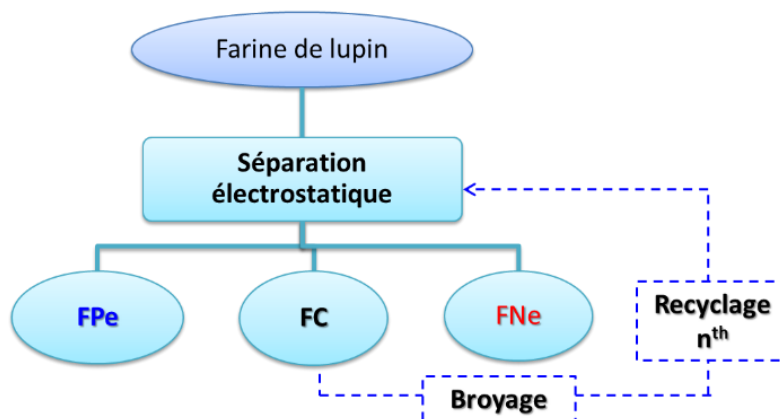


Figure 13 : Schéma simplifié des étapes de recyclage réalisées par Wang *et al.* (2016). Note : FPe : fraction positive de l'électrode, FC : fractions de collecte et FNe : fraction négative de l'électrode.

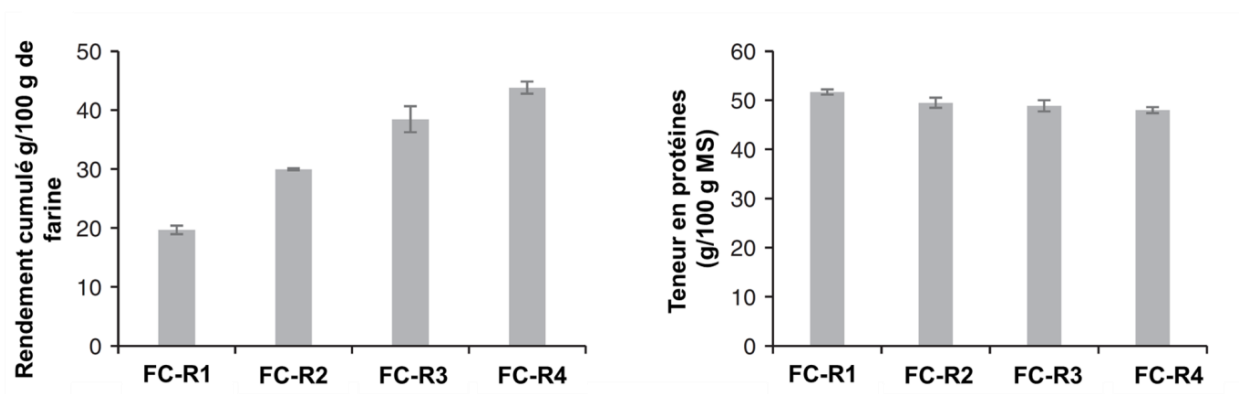


Figure 14 : Rendement de récupération cumulé et teneur en protéines après chaque étape de recyclage de la farine de pois (Wang *et al.*, 2016). (Note : FC-R : fraction de collecte recyclée).

Après la première étape de séparation, la fraction positive de l'électrode (FPe) contenant les protéines a été récupérée et le reste a été de nouveau broyé (pour tenter de dissocier davantage la matière première) avant de subir une nouvelle étape de tri. En répétant ce processus jusqu'à épuisement de la matière première (après quatre étapes de recyclage), le rendement cumulé de la fraction protéique a pu être multiplié par cinq sans diminution significative de la teneur en protéines après chaque étape de séparation (Figure 14).

3.2.2. Turbo-séparation

La turbo-séparation est un procédé qui permet de séparer des particules en fonction de leur taille et de leur densité. Comme l'indique le schéma 3, la séparation s'effectue à l'intérieur d'un rotor de tri (ou de classification) tournant à une vitesse fixée par l'opérateur. Les particules de faible taille et densité sont séparées des autres en passant à travers la grille du cylindre de tri. Cette technique de séparation a été largement utilisée dans l'industrie agroalimentaire pour la production de fractions enrichie en protéines (Hansen *et al.*, 2017; Pelgrom *et al.*, 2013; Pascalle J.M. Pelgrom *et al.*, 2014; Schutyser *et al.*, 2015; Sosulski and Youngs, 1979). En effet, les corps protéiques ayant une taille moyenne (D_{50}) très faible, de l'ordre de 4 à 20 μm (Hemery *et al.*, 2009), cette caractéristique permet de les séparer des autres particules plus grosses, tels que les granules d'amidon dans le cas de farines de graines de lupin (Pascalle J.M. Pelgrom *et al.*, 2014).

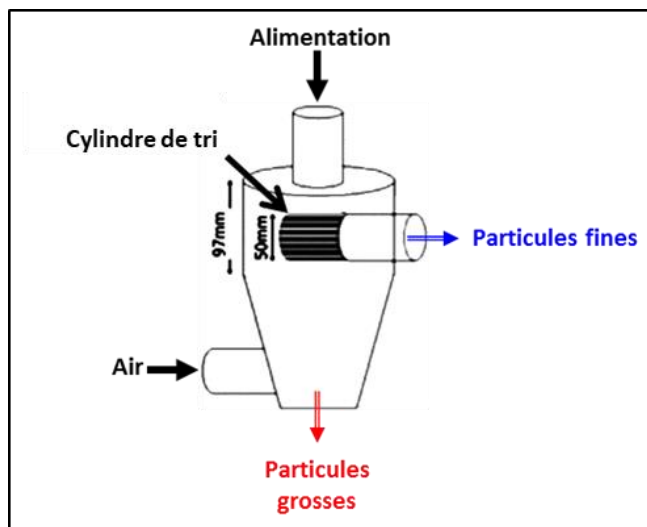


Schéma 3 : Principe de la turbo-séparation.

Récemment, cette technique de séparation a été appliquée à un tourteau de colza afin de diminuer sa teneur en fibres (Hansen *et al.*, 2017). Dans cette étude, les auteurs ont préalablement effectué un tamisage avant de réaliser la turbo-séparation, ce qui a permis d'éliminer la plupart des pellicules et de récupérer une fraction riche en amandes, où les protéines sont les plus concentrées.

Comme nous venons de le voir, la turbo-séparation est une technique qui peut s'avérer efficace pour séparer les différents constituants de diverses biomasses. Cependant, en raison du principe même de ce type de séparation, l'enrichissement en composés d'intérêt, comme les protéines, peut être limité lorsque les particules diffèrent trop peu de par leur taille et/ou leur densité (Tabatabaei *et al.*, 2017).

4. PRETRAITEMENTS ENZYMATIQUES DES MATIERES PREMIERES POUR LA LIBERATION D'ACIDES PHENOLIQUES

Comme vu précédemment dans la **partie 2.3.2.4**, les composés phénoliques des tourteaux de colza et de tournesol se trouvent majoritairement dans l'amande sous forme d'esters d'acides phénoliques libres. En revanche, il n'existe pas de données dans la littérature indiquant la présence de composés phénoliques estérifiés au réseau lignocellulosique des tourteaux, qui se

trouve essentiellement dans les pellicules pour le colza et les coques pour le tournesol, et qui confère à la graine une protection contre les contraintes extérieures (Isikgor and Becer, 2016).

Or, dans le réseau lignocellulosique, la lignine assure la cohésion entre les molécules de cellulose et d'hémicellulose au travers de liaisons covalentes de type éther ou ester (Figure 15) impliquant des acides hydroxycinnamiques tels que l'acide férulique ou l'acide *p*-coumarique. Pour avoir accès aux composés phénoliques de la matrice lignocellulosique, celle-ci doit donc être déstructurée.

Il existe diverses techniques de prétraitements des matières premières qui permettent d'améliorer l'accessibilité aux différents composés d'intérêt et d'augmenter leur extractabilité.

Par exemple, les prétraitements mécaniques et chimiques sont connus pour être les plus efficaces à déstructurer le réseau lignocellulosique. Ils présentent en revanche divers inconvénients majeurs comme le fait d'être énergivores et coûteux, d'être mis en œuvre dans des conditions de pH et de température élevées et de conduire à la formation de produits de dégradation (Schroyen *et al.*, 2014).

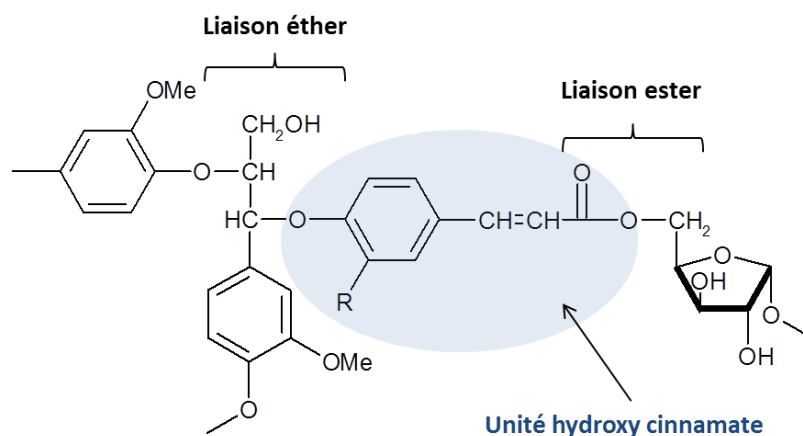


Figure 15 : Liaisons éther et ester entre la lignine et les unités hydroxycinnamates. R = H : *p*-coumarate, R = OCH₃ : férulate.

De ce fait, les procédés enzymatiques alliant conditions réactionnelles douces et sélectivité d'action, représentent une alternative intéressante aux procédés chimiques agressifs de prétraitement des matières premières lignocellulosiques (Cherubini, 2010; Galbe and Zacchi, 2012; Schroyen *et al.*, 2014).

4.1. HYDROLYSE D'ESTERS D'ACIDES PHENOLIQUES PAR VOIE ENZYMATIQUE

Les traitements enzymatiques sont des procédés sélectifs réalisés dans des conditions douces et ne nécessitant pas un apport important en énergie ou en réactif. Les feruloyl estérases (FAEs), aussi connues sous le nom d'acide férulique estérases, chlorogénate estérases, acide cinnamique estérases ou cinnamoyl estérases, font partie de la classe des esters carboxyliques hydrolases (3.1.1). Les FAEs sont associées à la libération des acides phénoliques estérifiés aux parois cellulaires des plantes ou à la lignocellulose (Benoit *et al.*, 2008; Gopalan *et al.*, 2016) grâce à des réactions d'hydrolyse de la fonction ester entre les carbohydrates et les acides phénoliques.

Ces enzymes trouvent de nombreuses applications industrielles notamment dans l'alimentaire, la papeterie ou la production de biocombustibles (Benoit *et al.*, 2008; Bonnin *et al.*, 2002; Faulds, 2010; Gopalan *et al.*, 2015; Shin *et al.*, 2006). Dans le chapitre qui suit, nous nous proposons de donner quelques exemples de production et d'utilisation des FAEs pour la libération d'acides phénoliques à partir de différentes matières premières.

4.1.1. Production des FAEs

Les FAEs sont produites par des champignons filamenteux ou par des bactéries via des procédés de fermentation liquide ou solide. Généralement, des déchets agroalimentaires riches en acide férulique (son de blé, glumes d'avoine ou pulpe de betterave) sont utilisés comme source de carbone et d'inducteur enzymatique (Gopalan *et al.*, 2015) et des esters d'acide férulique synthétiques (férulate de méthyl ou éthyle) sont ajoutés aux milieux de culture afin d'accélérer la production de FAEs.

La fermentation à l'état solide est le procédé le plus utilisé pour la production de FAEs. Cette technique permet d'obtenir des enzymes plus productives et augmente la stabilité des enzymes libérées. Il s'agit d'une méthode facile à mettre en œuvre et qui permet d'être proche des conditions naturelles de croissance de plusieurs microorganismes, en particuliers les champignons. En outre, elle permet l'utilisation directe des déchets agroalimentaire comme source de carbone (Asther *et al.*, 2002; Singhania *et al.*, 2009; Viniegra-González *et al.*, 2003).

Certains auteurs ont réalisé des comparaisons entre fermentation à l'état solide ou liquide pour la production de FAEs. Par exemple, Asther *et al.* (2002) ont comparé ces deux types de fermentation lors de la production de FAEs par *Aspergillus niger* I-1472 en utilisant comme source de carbone de la pulpe de betterave. Les substrats utilisés pour mesurer l'activité des FAEs produites ont été le sinapate de méthyle, le férulate de méthyle, le *p*-coumarate de méthyle et le caféate de méthyle. Les résultats ont montré que l'activité maximale des enzymes produites par ces deux procédés était obtenue après 4 jours d'incubation et que les activités enzymatiques vis-à-vis du sinapate de méthyle et du férulate de méthyle étaient les mêmes, quel que soit le mode de fermentation. Cependant, ils ont observé que l'activité de la FAE produite par fermentation à l'état solide était beaucoup plus importante envers le caféate de méthyle et le *p*-coumarate de méthyle, que celle de la FAE produite par fermentation liquide. Ces observations ont permis de mettre en évidence que le procédé de production des enzymes pouvait entraîner des modifications de leur spécificité envers différents substrats.

Il existe ainsi différents types de FAEs qui diffèrent de par leur spécificité de substrat et leurs propriétés physiques et qui peuvent être classées en quatre groupes, A, B, C et D (Crepin *et al.*, 2004) comme le montre le Tableau 4 ci-dessous.

	Feruloyl estérases			
	Type A (<i>A. niger</i>)	Type B (<i>A. niger</i>)	Type C (<i>A. niger</i>)	Type D (<i>Pen. Equi</i> EstA)
Spécificité envers les esters d'acides hydroxycinnamiques	Esters d'a. férulique, sinapique et <i>p</i> -coumarique	Esters d'a. férulique, caféique et <i>p</i> -coumarique	Esters d'a. férulique, sinapique et <i>p</i> -coumarique	Esters d'a. férulique, sinapique, caféique et <i>p</i> -coumarique
Libération des diférulates	Oui (5-5')	Non	Oui (5-5')	Non

Tableau 4 : Différents types de FAEs ainsi que leur spécificité envers les esters d'acides hydroxycinnamiques (Faulds, 2010).

Actuellement, les deux principales FAEs produites par *Aspergillus niger* qui suscitent le plus d'intérêt sont les FAEs de type A et B (Crepin *et al.*, 2004; Faulds, 2010; Faulds and Williamson, 2018). La FAE de type A est une petite protéine de 30 kDa avec un point isoélectrique (pI) de 3,3. Elle est produite en présence de xylane et possède une spécificité envers les noyaux phénoliques substitués avec des groupements méthoxy. En revanche, la FAE de type B produite en présence

de pulpe de betterave est une protéine plus large de 74 kDa, avec un pI de 4,9 et une préférence pour les substrats contenant des noyaux phénoliques à groupements hydroxyles. Finalement, les FAEs de type C et D ont des spécificités envers plusieurs types d'esters d'acides hydroxycinnamiques et présentent des différences dans leur capacité à libérer des diférulates des parois cellulaires ou de la lignocellulose. Faulds (2010), a réalisé une nomenclature des différents types de FAEs. Il a proposé d'utiliser les lettres du microorganisme utilisé pour la production de l'enzyme, suivi de « Fae », pour montrer qu'il s'agit d'une enzyme avec une activité de type feruloyl estérase, et enfin une lettre terminale pour désigner son type d'activité. Par exemple, une FAE de type A produite par *A. niger* sera nommé AnFaeA. Cette classification en quatre groupes a été étendue et améliorée par la suite même si elle continue toujours à être largement utilisée par la communauté scientifique.

4.1.2. Utilisation des feruloyl estérases pour la libération d'acides phénoliques

De nombreuses études relatent l'efficacité des FAEs à libérer les acides phénoliques de différentes matières premières. Dans ce contexte, nous avons regroupé dans le Tableau 5 les résultats des études concernant la libération d'acides phénoliques de plusieurs matières premières agricoles par l'action des FAEs.

Kroon *et al.* (2000) par exemple, ont réussi à isoler une FaeB à partir du champignon filamenteux *Penicillium funiculosum* (PfFaeB). Cette enzyme a été ensuite utilisée pour libérer des acides hydroxycinnamiques présents dans du son de blé. Ils ont réussi à libérer 98 % (3,3 mg/g MS) d'acide férulique potentiellement libérable en utilisant une concentration de 1 U/g de PfFaeB et 200 U/g de xylanase.

Benoit *et al.* (2006) quant à eux, ont utilisé AnFaeA et AnFaeB pour la libération d'acides hydroxycinnamiques présent dans diverses matières premières : pulpe de café, marc de pomme, pulpe de betterave, son de maïs et paille de blé. Les matières premières ont d'abord été hydrolysées en milieu alcalin dans le but de libérer, extraire et quantifier les différents acides phénoliques présents dans chaque matière première et ainsi avoir la quantité maximale (100%) potentiellement libérable de chaque composé. Ensuite, ils ont montré que l'utilisation d'AnFaeB conduisait à la libération de 100 % d'acide caféique (2,66 mg/g MS), 73 % d'acide *p*-coumarique

(0,06 mg/g MS) et 40 % d'acide férulique (0,10 mg/g MS) initialement présents dans la pulpe de café et de 83% (0,26 mg/g MS) d'acide caféique et 34% d'acide *p*-coumarique (0,08 mg/g MS) initialement présents dans le marc de pomme. Par contre, l'utilisation d'AnFaeA n'a pas permis la libération d'acides hydroxycinnamiques dans ces deux matières premières. En effet, AnFaeA ne reconnaît pas les acides hydroxycinnamiques qui ne contiennent pas de groupements méthoxy aromatiques. Par la suite, ils ont montré que l'utilisation d'AnFaeB sur la paille de blé traitée par explosion à la vapeur, permettait la libération de 60 % d'acide *p*-coumarique (1,27 mg/g MS), 58 % d'acide férulique (0,78 mg/g MS) et que l'utilisation d'AnFaeA permettait aussi la libération de 5 % d'acide *p*-coumarique (0,10 mg/g MS) et de 40% d'acide férulique (0,54 mg/g MS) mais dans des proportions plus faibles.

Matière première	Enzyme	pH	Température (°C)	Acide phénolique libéré	Efficacité	Référence
Son de blé	PfFaeB (1U/g) + xylanase (200 U/g)	6,0	37	férulique	98%	Kroon <i>et al.</i> (2000)
Pulpe de café	AnFaeB (5 nkat/g)	6,0	37	caféique	100%	Benoit <i>et al.</i> (2006)
				<i>p</i> -coumarique	73%	
				férulique	40%	
Marc de pomme				caféique	83%	
				<i>p</i> -coumarique	34%	
Paille de blé	AnFaeA (5 nkat/g)	6,0	37	<i>p</i> -coumarique	60%	Benoit <i>et al.</i> (2006)
				férulique	58%	
Son de maïs				férulique	8%	
Pulpe de café				n.d.	n.d.	
Marc de pomme				n.d.	n.d.	
Paille de blé	AnFaeA (39 nkat/g)	5,5	55	<i>p</i> -coumarique	5%	Benoit <i>et al.</i> (2006)
				férulique	40%	
Son de maïs	FAE (0,1% m/m)	5,5	37	férulique	40%	Vuorela <i>et al.</i> (2003)
Extrait MeOH d'un tourteau de colza				sinapique	n.d.	
Tourteau de colza	FAE (0,1% m/m)	5,5	37	sinapique	n.d.	Vuorela <i>et al.</i> (2004)
Tourteau de colza	AnFaeA (39 nkat/g)	5,5	55	sinapique	68-76%	Odinot <i>et al.</i> (2017)

Tableau 5 : Libération d'acides phénoliques de différentes matières premières agricoles par l'action de FAEs. *Par rapport aux teneurs en CPT. n.d. : non déterminé.

Finalement, ils ont aussi observé qu'AnFaeA libérait plus d'acide férulique dans le son de maïs (40%, 12,5 mg/g MS) par rapport à AnFaeB (8%, 2,5 mg/g MS). Ainsi, les auteurs ont montré que

les activités des enzymes étaient fortement dépendantes de la nature de la matrice à laquelle elles étaient appliquées. De leur côté, Vuorela *et al.* (2003) ont étudié l'hydrolyse enzymatique des esters d'acides sinapique présents dans un tourteau de colza. Dans cette étude, les auteurs ont utilisé plusieurs types d'enzymes (FAE commerciale, estérase, cellulases, etc.) et l'hydrolyse a été réalisée sur l'extrait méthanolique sec du tourteau. En parallèle, l'hydrolyse a été également effectuée avec de la soude à différentes concentrations (2M et 4M). Dans cette étude, l'identification et la quantification des composés phénoliques individuels ont été réalisées par HPLC-UV et les teneurs en CPT déterminées par la méthode spectrophotométrique de Folin-Ciocalteu (F-C). Les différents résultats obtenus ont été comparés avec les valeurs obtenues avant les différents procédés d'hydrolyse en termes de teneurs en sinapine (composé majoritaire du tourteau de colza, $5,048 \pm 0,029$ mg d'EAS/g MS), acide sinapique (produit de l'hydrolyse, $0,454 \pm 0,001$ mg/g MS) et CPT ($11,183 \pm 0,365$ mg d'EAS/g MS). Les auteurs ont montré que, parmi toutes les enzymes employées, l'utilisation de l'enzyme FAE à une concentration de 0,1% (m/m par rapport à la teneur en CPT) permettait l'hydrolyse quasi totale de la sinapine ($0,28 \pm 0,103$ mg d'EAS/g MS) en acide sinapique ($5,349 \pm 0,846$ mg/g MS), sans perte de CPT ($11,020 \pm 1,251$ mg d'EAS/g MS). De même, l'hydrolyse avec de la soude à 4M permettait d'hydrolyser toute la sinapine (0 mg EAS/g MS) en acide sinapique (5,555 mg/g MS), mais qu'elle était accompagnée d'une perte significative en CPT ($8,678 \pm 0,002$ mg d'EAS/g MS).

Dans une autre étude (Vuorela *et al.*, 2004), ces mêmes auteurs ont étudié l'action directe de la même FAE commerciale sur un tourteau de colza. Dans cette étude, ils ont comparé l'extraction assistée par l'enzyme FAE à 0,1% (m/m par rapport à la teneur en CPT) avec d'autres types d'extractions : extractions hydro-alcoolique, à l'eau et au CO₂ supercritique. Les résultats obtenus ont été comparés en fonction des composés phénoliques individuels (dosés par HPLC-UV) et totaux (dosé par la méthode de F-C) obtenus après chaque type d'extraction. Il est ressorti que le méthanol à 70% permettait d'extraire $3,070 \pm 0,138$ mg/g MS de sinapine, $0,170 \pm 0,05$ mg/g MS d'acide sinapique et $6,580 \pm 0,600$ mg d'EAS/g MS de CPT.

D'autre part, ils ont montré que l'extraction assistée par l'enzyme FAE permettait de récupérer une quantité supérieure en CPT ($6,940 \pm 0,320$ mg d'EAS/g MS) mais que les quantités obtenues en sinapine ($0,170 \pm 0,022$ mg/g MS) et en acide sinapique ($1,700 \pm 0,239$ mg/g MS) n'était pas

équivalente aux valeurs obtenues après l'extraction au méthanol à 70%. Si l'explication de cette perte en sinapine et/ou acide sinapique n'a pu être donnée par les auteurs, ils ont néanmoins précisé que la méthode de F-C utilisée pour la détermination en CPT conduisait probablement à une surestimation des valeurs et ne permettait donc pas de déterminer correctement la concentration réelle en CPT après hydrolyse enzymatique avec la FAE.

Plus récemment, Odinet *et al.* (2017) ont proposé un procédé enzymatique en deux étapes pour la production de canolol (2,6-Diméthoxy-4-vinylphénol) à partir d'un tourteau de colza. La première étape consistait à produire de l'acide sinapique par l'hydrolyse des esters d'acide sinapique en présence de AnFaeA, AnFaeB et d'une chlorogénate estérase nommé ChIE. Dans la deuxième étape, l'acide sinapique produit précédemment était transformé en canolol en présence du champignon *N. lepideus* BRFM15. Les résultats ont montré que seul AnFaeA était capable d'hydrolyser les esters d'acides sinapiques de colza, à l'exception de certains dérivés à base de kaempférol, avec des rendements compris entre 68 et 76 %.

5. EXTRACTION DES COMPOSES PHENOLIQUES SIMPLES DES TOURTEAUX DE COLZA ET DE TOURNESOL

En raison de sa simplicité, de son efficacité et de sa large gamme d'applications, l'extraction solide-liquide (Soxhlet ou macération) est la technique la plus utilisée pour l'extraction des acides phénoliques simples des matières végétales tels que les tourteaux de colza et de tournesol (Stalikas, 2007). Il existe d'autres méthodologies, comme les extractions assistées par ultrasons (Szydłowska-Czerniak and Tułodziecka, 2015, 2015) et par microondes (Khattab *et al.*, 2014; Niu *et al.*, 2013) qui ont montré une efficacité d'extraction supérieure, mais ces technologies demeurent coûteuses en énergie et difficilement transposables à l'échelle industrielle.

5.1. EXTRACTIONS AUX SOLVANTS

Différents facteurs tels que la polarité du solvant, le pH, la température, le ratio masse d'échantillon/volume de solvant, ainsi que la composition chimique des échantillons jouent un rôle important dans la procédure d'extraction (Stalikas, 2007) qui est généralement précédée d'une étape de préparation de l'échantillon. Dans le cas des tourteaux oléagineux,

les échantillons sont préalablement délipidés, puis broyés afin de les homogénéiser.

Les solvants les plus couramment utilisés pour l'extraction d'acides phénoliques simples sont l'eau, le méthanol, l'éthanol, l'acétone, le diéthyl éther et l'acétate d'éthyle ainsi que des combinaisons de ceux-ci. Cependant, en fonction de la polarité du solvant utilisé, certains composés indésirables tels que des sucres ou des protéines de faible poids moléculaire peuvent être extraits, entraînant des étapes supplémentaires de purification (centrifugation, précipitation par changement de pH). D'après le Tableau 6, qui présente quelques exemples représentatifs de la littérature, il ressort que le méthanol est le solvant le plus utilisé et le plus efficace pour l'extraction des composés phénoliques simples de colza et de tournesol.

Tourteau	Solvant	Température (°C)	Temps	CPT (mg/g MS)*	Méthode de quantification	Référence
Colza	Méthanol (pur)	Reflux	20 min	20,07 ± 0,74 (HPLC) 21,96 ± 1,94 (F-C)	HPLC et F-C	Cai and Arntfield (2001)
	Méthanol (pur)	75	2 x 20 min	19,9 ± 0,22	F-C	Zago <i>et al.</i> (2015)
	Méthanol aq. (50%, v/v)	t.a.	3 x 1 h	13,8-18,2	F-C	Szydłowska-Czerniak <i>et al.</i> (2010b)
	Méthanol aq. (70%, v/v)	75	20 min	6,5 ± 0,6	F-C	Vuorela <i>et al.</i> (2004)
Tournesol	Méthanol aq. (60%, v/v)	t.a.	1 h	41,7 ± 0,3	HPLC	Weisz <i>et al.</i> (2009)
	Ethanol aq. (80%, v/v)	t.a.	3 x 30 min	1,3 ± 0,06	HPLC	Pedrosa <i>et al.</i> (2000)
	Méthanol aq. (80%, v/v)	60°C	2 x 15 min	n.d.	HPLC	Karamać <i>et al.</i> (2012)
	Acétone aq. (70%, v/v)	t.a.	30 min	18,2	F-C	Zilic <i>et al.</i> (2010)

Tableau 6 : Quelques exemples de méthodes d'extraction des composés phénoliques simples des tourteaux de colza et de tournesol. Pour le colza, la teneur en CPT est exprimée en mg d'équivalent d'acide sinapique (EAS)/g MS. Pour le tournesol, la teneur en CPT est exprimée en mg d'équivalent d'acide chlorogénique (EAC)/g MS. (t.a : température ambiante, n.d. : non déterminé, CPT : composé phénolique totaux, F-C : Folin-Ciocalteu).

Cai and Arntfield (2001) ont réalisé l'extraction avec du méthanol pur (50°C, 10 min ; 75°C, 20 min ; reflux, 20 min) et du méthanol aqueux à 70 %, v/v (75°C, 20 min). Ils ont montré que les meilleurs rendements d'extraction en CPT étaient obtenus avec le méthanol à 70% v/v (75°C, 20

min) et le méthanol à reflux (20 min) et qu'ils n'étaient pas significativement différents ($22,58 \pm 1,22$ mg EAS/g MS et $20,07 \pm 0,74$ mg EAS/g MS). Néanmoins, les mêmes auteurs ayant reconnu que les extractions réalisées avec des mélanges aqueux pouvaient conduire à l'extraction de composés indésirables et donc à des erreurs, il est préférable de retenir comme méthode de choix une extraction de 20 minutes à reflux du méthanol.

5.2. QUANTIFICATION DES COMPOSES PHENOLIQUES SIMPLES

La méthode la plus utilisée pour la quantification des CPT des extraits naturels est la méthode spectrophotométrique de Folin-Ciocalteu (F-C). Le principe de cette technique est basé sur la réduction de l'acide phospho-molybdène-tungstène (réactif de Folin) par les acides phénoliques en solution alcaline. Cependant, le réactif de Folin n'est pas spécifique et peut réagir avec d'autres espèces réductrices contenant des groupements hydroxyles telles que des sucres et des protéines (Ikawa *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006; Peterson, 1979; Szydłowska-Czerniak *et al.*, 2010a, 2010b; Vuorela *et al.*, 2004; Ye *et al.*, 2015). Pour autant, cette technique de quantification continue à être largement utilisée, tout particulièrement lorsqu'il n'existe pas de standards commerciaux correspondant aux différentes molécules présentes dans des extraits naturels. L'autre méthode de quantification des CPT est la chromatographie liquide haute performance (HPLC) qui permet de séparer les acides hydroxycinnamiques et de les doser individuellement, notamment par spectrophotométrie, puisqu'ils absorbent à des longueurs d'ondes comprises entre 300 et 330 nm (Khattab *et al.*, 2010; Méndez and Lojo, 1968). Khattab *et al.* (2010) ont dosés par HPLC-UV les CPT et les composés phénoliques individuels de dix-huit variétés de graines de colza différentes, trois gâteaux tourteaux de colza (co-produit obtenu après trituration à froid des graines de colza) et sept tourteaux de colza, après extraction au méthanol aqueux à 70% (v/v). Pour la teneur en CPT, la méthode de quantification par F-C et par HPLC ont été comparées. Quelques exemples des résultats obtenus dans cette étude peuvent être observés dans le Tableau 7.

Les auteurs ont montré que les résultats obtenus par HPLC en termes de CPT étaient très proches des valeurs obtenues en réalisant la somme des teneurs en composés phénoliques individuels (déterminées par HPLC avec des courbes de calibrations correspondantes à chaque composé).

Par contre, dans tous les cas, les valeurs obtenues par la méthode de F-C pour les teneurs en CPT étaient supérieures aux résultats obtenus par la méthode de quantification par HPLC. En effet, ils expliquent que l'utilisation du mélange hydro-alcoolique a conduit à l'extraction des composés phénoliques simples mais également à d'autres molécules qui, en réagissant avec le réactif de F-C, ont conduit à une surestimation des concentrations en CPT.

Matière première	Sinapine (SNP)	Sinapoyl glucose (SG)	Acide sinapique (AS)	SNP+SG+AS	CPT (mg EAS/g MSD)*	
					HPLC**	F-C
Graines						
G1	11,89 ± 0,36	3,04 ± 0,06	0,20 ± 0,01	15,13	13,79	17,77 ± 0,07
G2	9,58 ± 0,00	6,65 ± 0,00	0,20 ± 0,00	16,43	15,33	18,46 ± 0,71
G3	11,73 ± 0,32	1,13 ± 0,03	0,11 ± 0,00	12,97	12,55	16,30 ± 0,50
Gâteau						
Ga1	11,17 ± 0,27	2,58 ± 0,06	0,29 ± 0,01	14,04	12,73	17,73 ± 0,31
Ga2	9,90 ± 0,02	4,01 ± 0,02	0,44 ± 0,00	14,35	13,71	19,71 ± 0,00
Tourteau						
T1	10,11 ± 0,10	1,37 ± 0,01	0,33 ± 0,00	11,80	11,19	16,66 ± 0,43
T2	6,11 ± 0,10	1,81 ± 0,02	0,41 ± 0,00	8,33	9,19	14,56 ± 0,37

Tableau 7 : Quantification des composés phénoliques individuels par HPLC-UV et détermination des CPT par HPLC et méthode de F-C des graines, gâteaux et tourteaux de colza réalisée dans l'étude de Khattab *et al.* (2010). Note : *CPT : composés phénoliques totaux, EAS : équivalent d'acide sinapique. **HPLC : valeurs obtenues en tenant compte de l'aire totale des pics de l'acide sinapique et de tous ses esters à 328 nm et en utilisant la courbe de calibration de l'acide sinapique.

6. LA LIPOPHILISATION COMME OUTIL POTENTIEL D'AMÉLIORATION DE LA CAPACITÉ ANTIOXYDANTE

Nous avons mentionné, dans la **partie 2.4.2**, la difficulté d'utiliser les acides phénoliques à caractère polaire pour lutter contre l'oxydation lipidique dans des systèmes lipidiques dispersés. En effet, ce type de composés se concentre dans la phase aqueuse du système lipidique diminuant ainsi son efficacité. Mais comment expliquer ce phénomène dans ce type de système ? Pour répondre à cette question, l'équipe de Porter (Porter *et al.*, 1989) a énoncé le *paradoxe polaire* qui stipule que les antioxydants à caractère polaire sont plus efficaces dans des solutions lipidiques homogènes que les antioxydants apolaires et, inversement, ces derniers sont plus actifs dans des milieux émulsionnés que leurs homologues polaires. Plus tard, Frankel (1996) a enrichi la théorie du *paradoxe polaire* en énonçant que dans les systèmes multiphasiques, l'oxydation avait lieu à l'interface des différentes phases montrant ainsi que dans ce type de système,

l'antioxydant hydrophobe doit être positionné proche de l'endroit où l'oxydation se produit pour qu'il soit le plus efficace. Le *paradoxe polaire* assume donc de façon implicite qu'il existe une relation entre l'hydrophobie et la capacité antioxydante des molécules dans les systèmes lipidiques dispersés, sans pour autant en préciser la nature. Un début de réponse est apporté par les travaux de Laguerre *et al.* (2009) qui ont mis en évidence dans ce type de systèmes un effet de seuil de l'hydrophobie sur la capacité antioxydante. Ils ont montré en effet que la capacité antioxydante d'un composé phénolique lipophilisé était amélioré avec l'augmentation de son hydrophobie jusqu'à atteindre un maximum au-delà duquel, la capacité antioxydante diminuait drastiquement. De ce fait, plusieurs auteurs ont suggéré de synthétiser de nouveaux composés phénoliques lipophilisés afin d'ajuster leur balance hydrophile/hydrophobe et, ainsi, améliorer leur capacité à agir contre l'oxydation lipidique dans des systèmes multiphasiques (Figuerola-Espinoza *et al.*, 2013; McClements and Decker, 2018).

Dans les sections qui suivent, nous nous proposons d'abord de fournir quelques rappels sur les méthodes d'évaluation de la capacité antioxydante, notamment en milieux émulsionné et homogène au travers des tests CAT et DPPH respectivement, puis de passer en revue les principales voies de lipophilisation des acides phénoliques et l'impact de cette modification sur la capacité antioxydante dans divers systèmes lipidiques.

6.1. METHODES D'ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE

Globalement, les tests d'évaluation de la capacité antioxydante reposent sur deux stratégies de mesure différentes mais complémentaires, dont le choix dépend principalement de la complexité du système d'étude.

La première stratégie, dite non compétitive, consiste à mesurer l'aptitude d'un antioxydant à réduire un radical libre ou un métal de transition en absence de tout substrat oxydable. Les méthodes ABTS, CUPRAC, FRAP ou DPPH qui relèvent de cette stratégie sont simples et rapides à mettre en œuvre car basées sur des systèmes homogènes aqueux ou organiques.

Dans le cas de la méthode DPPH, par exemple, le pouvoir antioxydant est mesuré par la capacité qu'a une molécule à réduire le radical stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH*) soit par

transfert d'un atome d'hydrogène, soit par don d'un électron. Le radical DPPH• possède une couleur pourpre et absorbe à une longueur d'onde de 515 nm. En présence d'un antioxydant, le radical DPPH• est réduit en DPPH-H (jaune) ce qui se traduit par une baisse de l'absorbance à 515 nm qui peut être suivie par spectrophotométrie jusqu'à l'établissement d'un état stationnaire. L'activité antiradicalaire est généralement exprimée comme la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer de 50 % la concentration initiale en DPPH• dans le milieu (EC₅₀).

Cependant, si ces méthodes constituent un moyen d'évaluer la réactivité chimique intrinsèque d'un antioxydant, elles permettent difficilement de prévoir son activité antioxydante dans des systèmes hétérogènes complexes (Alamed *et al.*, 2009).

Par opposition, les méthodes compétitives (ou directes) mettent en jeu un substrat dont le degré d'oxydation peut être mesuré à partir de (i) la consommation en oxygène, (ii) la formation de produits d'oxydation (primaires et secondaires), ou encore (iii) la disparition dudit substrat. Dans les deux premiers cas, qui s'adressent davantage aux milieux les plus complexes comme par exemple les matrices alimentaires, il s'agit de méthodes lentes et fastidieuses, nécessitant de larges volumes d'échantillon et, pour certaines, sujettes à de nombreux biais et interférences. Les méthodes relevant du dernier cas sont en revanche beaucoup plus simples car elles font intervenir des substrats oxydables renfermant un système polyénique conjugué ou un fluorophore dont la destruction peut être aisément suivie par spectrophotométrie en systèmes homogènes ou hétérogènes. Si de nombreuses méthodes sont basées sur ce principe (tests ORAC, BODIPY, co-oxydation de l'acide linoléique et du β -carotène...), la plupart d'entre elles utilise une quantité similaire ou un large excès d'antioxydant par rapport au substrat oxydable et ne mesurent donc pas une activité antioxydante telle que définie par Halliwell et Gutteridge (1995).

Afin de pallier ces différents écueils, Laguerre *et al.* (2008) ont développé la méthode des Triènes Conjugués Autooxydables (CAT) qui met en œuvre un substrat oxydable et un système hétérogène simples mais suffisamment représentatifs des conditions d'oxydation lipidique réelles et permettant :

- un suivi aisé de la dégradation du substrat oxydable par des méthodes spectroscopiques transposable au haut débit

- d'évaluer des antioxydants hydrophiles ou lipophiles,
- la mise en œuvre d'antioxydant en quantité faible par rapport à celle du substrat oxydable.

La méthode est basée sur suivi de l'oxydation d'une émulsion d'huile de tung (débarrassée de ses tocophérols) dans du tampon phosphate (pH 7,2) et stabilisée avec du Brij 35, un émulsifiant non ionique. L'huile de Tung est naturellement composée de triglycérides dont l'acide gras majoritaire est l'acide α -éléostéarique ($\approx 86\%$) dont la structure est représentée sur la Figure 16.

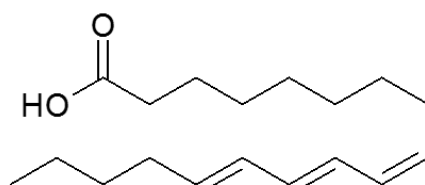


Figure 16 : Structure chimique de l'acide α -éléostéarique

Cet acide gras à 18 atomes de carbone possède un triène conjugué extrêmement sensible à l'oxydation qui absorbe fortement dans l'UV sous forme d'un signal trifide avec une longueur d'onde maximale de 273 nm. L'oxydation est accélérée par l'AAPH [2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochlorydrique] un azo-initiateur radicalaire hydrophile solubilisé dans la phase aqueuse. Le suivi spectrophotométrique de l'oxydation au travers de la mesure de la décroissance de l'absorbance à 273 nm, en présence et absence d'antioxydant, conduit à une détermination directe de la capacité d'une molécule à protéger cette huile de l'oxydation.

6.2. VOIES DE SYNTHESES POUR LA LIPOPHILISATION DES COMPOSES PHENOLIQUES

Comme évoqué en **section 2.4.2.**, la lipophilisation des acides phénoliques est une stratégie qui a été envisagée pour moduler leur balance hydrophile/hydrophobe et améliorer leur capacité antioxydante dans des milieux multiphasiques. Généralement, cette modification consiste à associer de façon covalente des groupements lipidiques via différents types de réactions (éthérification, estérification, amidation) et d'approches catalytiques (homogène vs hétérogène, chimique vs enzymatiques) en fonction de la structure et de la réactivité des substrats de départ (Figueroa-Espinoza *et al.*, 2013; Figueroa-Espinoza and Villeneuve, 2005). Les produits issus des réactions de lipophilisation des composés phénoliques sont classiquement nommés « phénolipides ».

A ce jour, la majorité des réactions de lipophilisation des acides phénoliques a été réalisée par voies chimique, enzymatique ou chimio-enzymatique, au travers de réactions d'estérification de la fonction acide (-COOH) ou de la fonction phénol (-OH), avec respectivement des alcools gras ou des acides gras aliphatiques de longueur variable. Néanmoins, l'estérification de la fonction acide reste la voie de synthèse privilégiée car elle permet de préserver les hydroxyles phénoliques responsables de l'activité antioxydante. Nous y avons donc consacré les chapitres qui suivent.

6.2.1. Voie chimique

Un exemple de voie synthèse de phénolipides par voie chimique est l'estérification de Fisher, qui permet l'estérification des acides phénoliques avec une grande chimio-sélectivité. Quelques exemples trouvés dans la littérature sont présentés dans le Tableau 8.

Acide phénolique	Alcool aliphatique (nb de carbone)	Solvant	Catalyseur	T (°C)	Temps	Rendement	Réf.
Sinapique	1 à 4	Milieu fondu	H ₂ SO ₄	t.a.	5 jours	79-83%	Gaspar <i>et al.</i> (2010)
Sinapique, Caféique, férulique	8	Milieu fondu	H ₂ SO ₄	100	2-3 h	67-93%	Szydłowska-Czerniak <i>et al.</i> (2018)
Protocatéchique	1 à 18	THF	H ₂ SO ₄	45-65	5-10 jours	59-94%	Grajeda-Iglesias <i>et al.</i> (2016)
Rosmarinique	1 à 20	Milieu fondu	Résine Amberlite® IR-120H	55-70	4-21 jours	82-99%	Lecomte <i>et al.</i> (2010)
<i>p</i> -coumarique, caféique et férulique	1 à 20	THF	H ₂ SO ₄	55	--	>90%	Sørensen <i>et al.</i> (2014)

Tableau 8 : Quelques exemples de synthèse de phénolipides (esters aliphatiques d'acides phénoliques) par réaction de Fisher. (t.a. : température ambiante).

Cette réaction s'effectue par catalyse acide en phase homogène (acides forts de type chlorhydrique, sulfurique ou para-toluène sulfonique) ou en phase hétérogène (résines sulfoniques), en présence de tamis moléculaire pour absorber l'eau générée pendant la réaction et éviter la réaction inverse d'hydrolyse de l'ester formé. Pour améliorer la conversion de l'acide phénolique en son ester correspondant, l'alcool gras peut être utilisé en large excès et jouer ainsi le rôle de réactif et de solvant. Ce type de réaction en milieu « fondu » est simple, rapide et permet d'accélérer la réaction d'estérification.

Cependant, elle est fortement dépendante de la température de fusion de l'alcool gras et de la solubilité de l'acide phénolique dans l'alcool fondu. Pour augmenter la solubilité des différents réactifs, un solvant peut être ajouté dans le milieu réactionnel. Cependant, l'ajout de solvant diminue la réactivité des acides phénoliques entraînant des temps de réactions plus élevés. Par ailleurs, malgré tous les avantages de cette voie de synthèse, ces conditions dures de réaction peuvent conduire à la formation de produits secondaires indésirables et à plusieurs étapes de purification pour éliminer les différents coproduits de la réaction (Pion *et al.*, 2013). De plus, les phénolipides synthétisés peuvent avoir des polarités très similaires aux alcools gras initiaux ce qui peut entraîner des difficultés de purification.

Une autre voie de synthèse de phénolipides est la réaction de Mitsunobu, qui permet la formation chimio sélective d'esters mais aussi d'éthers, d'azides et de nitriles avec inversion de configuration. Il s'agit d'une réaction de substitution nucléophile bimoléculaire (S_N2) sur un alcool (primaire ou secondaire), catalysée par une phosphine, telle que la triphénylphosphine (TPP), et un dérivé azo comme l'azodicarboxylate de diéthyle (DEAD). Le mécanisme réactionnel de la réaction de Mitsunobu peut être observé sur la Figure 17.

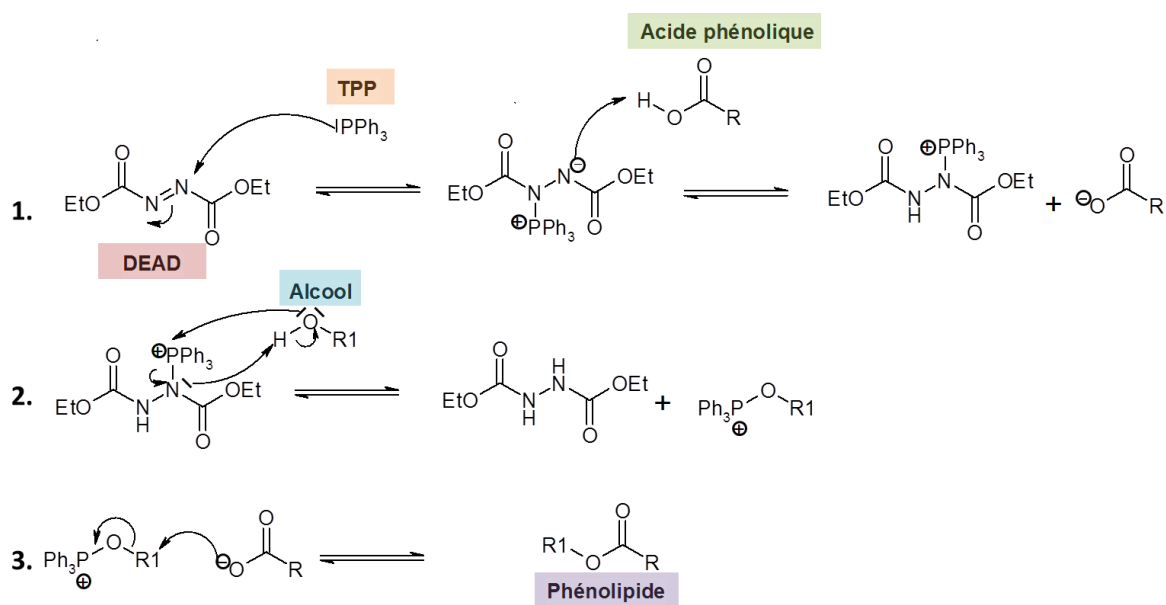


Figure 17 : Mécanisme de la réaction de Mitsunobu appliquée à la synthèse de phénolipides.

Ici, la fonction acide carboxylique de l'acide phénolique joue le rôle de l'espèce nucléophile tandis que les groupements hydroxyles du cycle aromatique restent inertes (Appendino *et al.*, 2003). En

effet, lorsque les réactifs sont introduits dans des conditions stœchiométriques, les aza-énolates stabilisés (bases faibles) assurent la déprotonation de la fonction carboxylique ($pK_a \approx 4$) et non celle des phénols ($pK_a \approx 10$).

Il est à noter que cette voie de synthèse a été utilisée dans plusieurs travaux de synthèse de phénolipides (Appendino *et al.*, 2003; Durand *et al.*, 2015; Reddy *et al.*, 2012).

6.2.2. Voie enzymatique

Les réactions par voie enzymatique attirent de plus en plus l'attention. En effet, elles sont plus sélectives et considérées comme des procédés plus respectueux pour l'environnement en raison des conditions de réaction plus douces (températures plus faibles, sans catalyseurs chimiques, etc.) qui engendrent moins d'étapes de purification et qui produisent moins de déchets (Figuerola-Espinoza and Villeneuve, 2005; Laguerre *et al.*, 2013; López Giraldo *et al.*, 2007). Cependant, à ce type de procédé sont associés des durées de réactions beaucoup plus longues, des coûts de catalyseurs élevés et des phénomènes d'inhibition/désactivation des enzymes liés aux conditions réactionnelles (nature des substrats, produits, solvants, pH, etc.).

Les enzymes qui permettent de réaliser ce type de réactions appartiennent à la famille des esters carboxyliques hydrolases comme par exemple les lipases, cutinases et féruloyl estérases. Les lipases, telles que la lipase B de *Candida antarctica*, ont largement été utilisées pour la synthèse de phénolipides (Sabally *et al.*, 2006, 2005; Zago *et al.*, 2015a). Quelques exemples trouvés dans la littérature sont exposés dans le Tableau 9. Immobilisées sur un support, ces enzymes sont tolérantes à une grande variété de solvants organiques (acétone, butanol, cyclohexane, diéthyle éther, etc.) et peuvent également être utilisées en milieu fondu (l'alcool joue le rôle de réactif et de solvant).

Par contre, ces enzymes sont très sélectives et leur site actif ne reconnaît pas certains acides phénoliques. Par exemple, la plupart des lipases ont une activité très faible lorsque la fonction acide carboxylique de l'acide phénolique (relié directement au cycle aromatique ou par une double liaison) est conjuguée avec un groupement hydroxyle –OH en position *para*- du cycle aromatique. Par exemple, Grajeda-Iglesias *et al.* (2016) ont essayé de réaliser la synthèse d'esters

de l'acide protocatéchique par voie enzymatique en présence de la lipase B de *Candida antarctica* mais ils n'ont pas observé la formation des différents esters du fait que l'acide protocatéchique possède une fonction hydroxyle en position *-para*. Par ailleurs, la présence de la double liaison en position β des acides hydroxycinnamiques diminue également l'efficacité des lipases (Pion *et al.*, 2013; Sabally *et al.*, 2005).

Acide phénolique	Alcool gras	Solvant	Enzyme	T (°C)	Temps	Rendement	Référence
Dihydrocaféique	C18:3	Hexane/2-butanone 75:25 (v/v)	Novozym 435 [®]	55	10 jours	99%	Sabally <i>et al.</i> (2005)
Férulique	C18:3	Hexane/2-butanone 75:25 (v/v)	Novozym 435 [®]	55	10 jours	16%	Sabally <i>et al.</i> (2005)
Dihydrocaféique	Trilinoléine, Trilinoléine	Hexane/2-butanone 75:25 (v/v)	Novozym 435 [®]		5 jours	62-66%	Sabally <i>et al.</i> (2006)
Caféique	n-butanol	n-butanol	Novozym 435 [®]	60	15 jours	0%	Figuroa-Espinoza and Villeneuve (2005)
Cinnamique						97%	
Dihydrocaféique						78%	
Férulique						Traces	

Tableau 9 : Quelques exemples de synthèse de phénolipides (esters d'acides phénoliques) par voie enzymatique. Note : Novozym 435[®] est le nom commercial de la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée, distribuée par la société Novozymes.

6.2.3. Voie chimio-enzymatique

Une stratégie intermédiaire est la synthèse par voie chimio-enzymatique en milieu fondu, qui est réalisée en deux temps. D'abord, l'acide phénolique de départ est converti par voie chimique en son ester méthylique (ou éthylique, vinylique) correspondant. L'ester formé est alors transestérifié en présence d'une enzyme et de l'alcool gras. Cette technique permet d'améliorer la solubilité des différents substrats dans le milieu réactionnel du fait que le méthyl ester phénolique est plus soluble dans les alcools gras que l'acide phénolique de départ. De plus, le méthanol (ou l'éthanol, ou l'alcool vinylique) libéré pendant la réaction de transestérification peut facilement être éliminé par évaporation, dirigeant ainsi la réaction vers la formation de l'ester désiré.

Cette technique a largement été utilisée pour la synthèse de différentes séries de phénolipides (López Giraldo *et al.*, 2007; Pion *et al.*, 2014, 2013; Reano *et al.*, 2015).

Par exemple, López Giraldo *et al.*, (2007) ont comparé la lipohilisation enzymatique et chimio-enzymatique de l'acide chlorogénique et de son ester méthylque en présence de *Candida antarctica* B immobilisée (Novozym 435®). Dans un premier temps, la formation de l'ester méthylque de l'acide chlorogénique a été réalisée avec 10 mmol d'acide chlorogénique en présence de 240 mL de méthanol à 55°C et de 10 g de résine sulfonique Amberlite IR 120 H. En fin de synthèse, les auteurs ont déterminé un rendement de 95% après purification. Ensuite, 56 µmol d'acide chlorogénique ou de son méthyl ester ont été mis en présence de 10 mL de différents alcools aliphatiques de longueur de chaîne alkyle allant de C4:0 à C16:0 à 55°C et sous agitation. Puis, trois concentrations d'enzymes ont été testées (2, 5 et 10 %, m/m calculé en fonction de la masse totale de tous les substrats). Les résultats obtenus à la fin de la synthèse peuvent être observé dans la Figure 18.

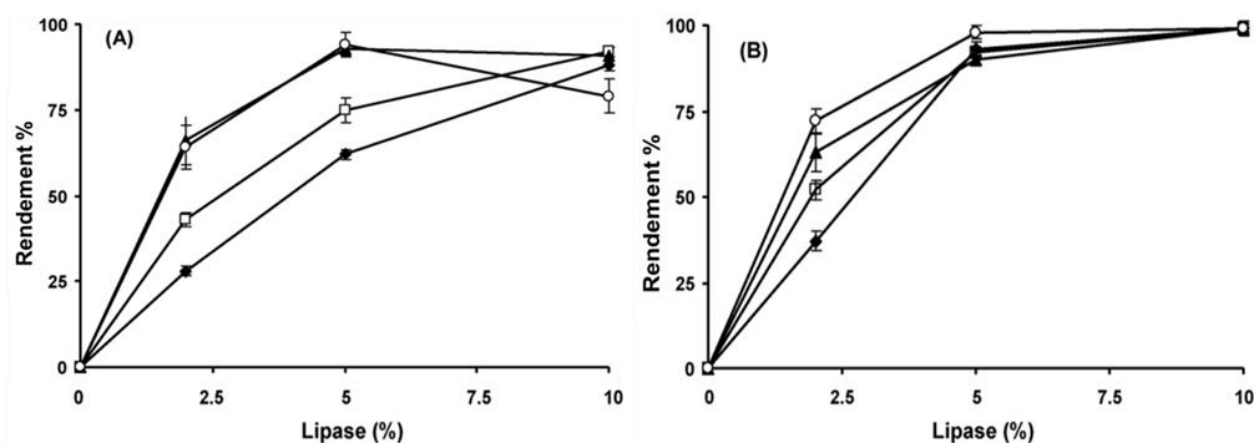


Figure 18 : Effet de la concentration en enzyme sur le rendement de formation des chlorogénates de butyle (□), octyle (▲), dodécyle (◆) et hexadécyle (○) pendant l'estérification de l'acide chlorogénique (A) et la transestérification du chlorogénate de méthyle (B).

Les résultats ont montré que, quelle que soit la concentration en enzyme, les rendements de formation de tous les chlorogénate d'alkyles étaient plus élevés lorsque la synthèse était réalisée par voie chimio-enzymatique (Figure 18-B) par rapport à la voie enzymatique (Figure 18-A).

Par ailleurs, ils n'ont pas observé de différence importante dans les rendements de formation des chlorogénate d'alkyles pour les concentrations en enzyme de 5% m/m et 10% m/m et ont donc fixé la concentration optimale en enzyme à 5% m/m.

Plus récemment, Hollande *et al.* (2018) ont réalisé la synthèse chimio-enzymatique de différents

esters à base d'acide férulique et de glycérol destinés à la synthèse de nouveaux biopolymères. L'objectif de cette étude était de réaliser des nouveaux composés de type di-esters phénoliques à base de produits issus de la biomasse lignocellulosique (comme l'acide férulique) et de la biomasse oléagineuses (tel le glycérol) ayant de bonnes propriétés antioxydantes.

Ici, le catalyseur utilisé a été la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée (iCAL-B) et ils ont montré la faisabilité de la transestérification sélective du férulate d'éthyle avec les hydroxyles primaires du glycérol (positions *sn*-1 et *sn*-3), laissant ainsi la position centrale intacte. Après purification, le rendement de récupération obtenu a été de l'ordre de 93%.

Dans un second temps, l'alcool secondaire libre a été estérifié par réaction de Steglich (estérification chimique) avec différents acides aliphatiques de longueur de chaîne alkyle allant de 10 à 16 atomes de carbone. Finalement, après purification, les rendements ont été de l'ordre de 81-87%

6.3. MISE EN EVIDENCE DE L'EFFET DE SEUIL DE L'HYDROPHOBIE SUR L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE EN SYSTEMES LIPIDIQUES DISPERSES

La méthode des Triènes Conjugués Autooxydables (CAT) a été mise en oeuvre dans plusieurs études et a permis de déterminer, pour différentes séries de phénolipides, l'influence de l'hydrophobie sur l'activité antioxydante.

Laguerre *et al.* (2009) ont ainsi évalué l'activité d'une série de chlorogénate d'alkyles dont la chaîne aliphatique comportait 1 à 20 atomes de carbone. Ils ont montré que l'activité antioxydante était améliorée avec l'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle jusqu'à atteindre un maximum pour l'ester en C12:0 (longueur de chaîne critique), longueur de chaîne au-delà de laquelle la capacité antioxydante chutait drastiquement (Figure 19-A). C'est au travers de ces résultats que « l'effet de seuil » de la capacité antioxydante en fonction de l'hydrophobie a été mis en évidence pour la première fois en milieu lipidique multiphasique. Dans une autre étude (Laguerre *et al.*, 2010), ces auteurs ont observé le même phénomène avec la série des rosmarinates d'alkyles, avec cette fois-ci une longueur de chaîne critique correspondant au C8:0 (Figure 19-B).

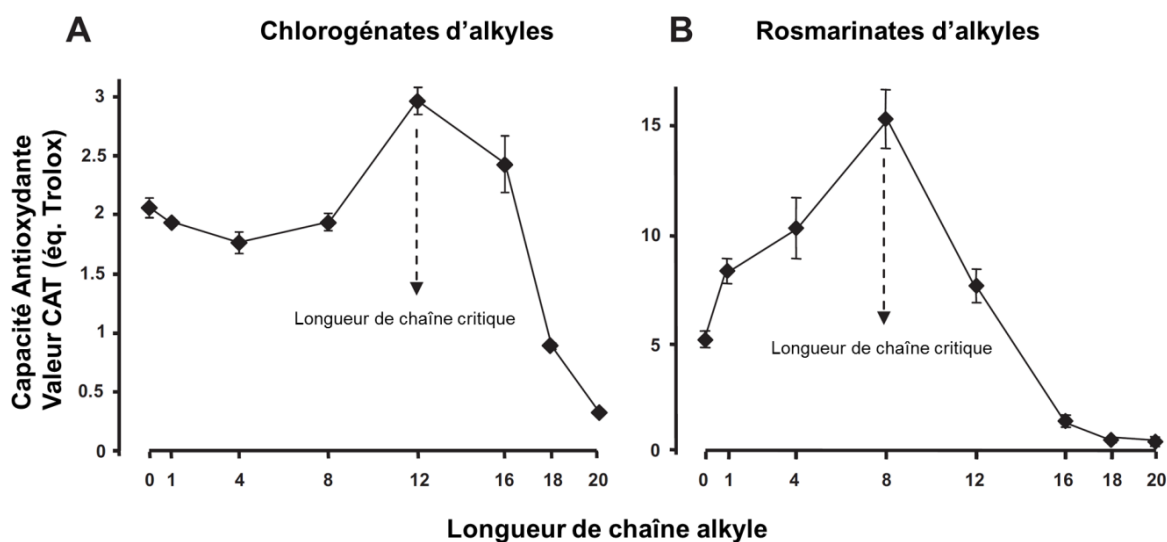


Figure 19 : Influence de la longueur de la chaîne alkyle sur la capacité antioxydante des chlorogénates (A) et rosmarinales (B) d'alkyles dans une micro-émulsion d'huile de tung sans tocophérols et stabilisée avec du Brij 35 (Laguerre *et al.*, 2010, 2009).

L'utilisation de ce test CAT a également permis d'observer un « effet de seuil » pour d'autres séries de phénolipides tels que les caféates, les férulates et les coumarates d'alkyles (Sørensen *et al.*, 2014), ainsi que les protocatéchuates d'alkyles (Grajeda-Iglesias *et al.*, 2016) et des dérivés du 4-vinyl guaiacol (Zago *et al.*, 2015a). L'effet « de seuil » a également été observé avec d'autres phénolipides dans d'autres types de microémulsion à base d'huile d'olive (Lopez de Arbina *et al.*, 2017) et d'huile de poisson (González *et al.*, 2015), démontrant ainsi que le phénomène n'était pas propre au test CAT lui-même mais lié à la nature du système lipidique et des antioxydants étudiés.

Comment expliquer alors ce phénomène en apparence contradictoire au *Paradoxe polaire* énoncé par Porter *et al.*, (1989) qui stipule que les antioxydants polaires sont plus actifs que leurs analogues apolaires dans les systèmes hydrophobes de type « bulk oil », tandis que les antioxydants apolaires sont plus actifs dans les émulsions H/E (huile-dans-eau), les liposomes, voire les tissus biologiques ?

Selon Laguerre et collaborateurs (Laguerre *et al.*, 2013), l'hypothèse peut être faite que, du fait de leur caractère amphiphile peu marqué et de leur faible affinité pour l'interface, les esters à chaîne courte se retrouvent dilués dans la phase aqueuse et peu concentrés à l'interface, ce qui

se traduit par une faible activité antioxydante. L'allongement de la chaîne alkyle a pour conséquence d'augmenter progressivement l'affinité des esters pour l'interface au détriment de la phase aqueuse, avec une amélioration de l'activité antioxydante jusqu'à ce qu'elle atteigne son maximum. Ce point est atteint pour une longueur de chaîne moyenne correspondant à la longueur de chaîne critique (LCC) où vraisemblablement l'orientation du groupement phénolique de l'ester vers la phase aqueuse est optimale.

Il est important de noter que ce qui précède n'est rien d'autre que ce que Frankel a avancé comme hypothèse en reliant *Paradoxe polaire* et phénomènes interfaciaux (Frankel, 1996): dans les émulsions H/E, les antioxydants apolaires se concentreraient à l'interface huile-eau (supposée être le site de l'oxydation lipidique) et inhiberaient l'oxydation plus efficacement que les antioxydants polaires dont la localisation serait essentiellement dans la phase aqueuse. De ce fait « l'effet de seuil » ne serait finalement pas une contradiction mais une simple extension du domaine de validité du *Paradoxe polaire*.

La question revient donc à savoir ce qui se passe après la LCC, lorsque la capacité antioxydante chute dramatiquement avec l'ajout de quelques carbones de plus dans la chaîne alkyle. Pour tenter d'y répondre, Laguerre et collaborateurs ont alors émis les hypothèses de la « mobilité réduite », de l'« internalisation » et de l'« d'auto-agrégation » des phénolipides dans les systèmes lipidiques dispersés (Laguerre *et al.*, 2013) :

(1) L'hypothèse de la « mobilité réduite » repose sur l'idée que, dans une émulsion, l'allongement de la chaîne alkyle d'un phénolipide lipophile réduit sa capacité à se mouvoir à proximité des sites de l'oxydation et diminue d'autant sa probabilité de rencontrer des espèces oxydantes et la fréquence de ces rencontres. La réduction de mobilité serait due à l'encombrement stérique de la chaîne aliphatique et aux fortes interactions de celle-ci avec la partie hydrophobe de l'émulsifiant et/ou de la phase lipidique, à sa surface ou en son cœur.

(2) L'hypothèse de l'« internalisation » suggère, quant à elle, que l'allongement de la chaîne alkyle se traduit par un déplacement des antioxydants de l'interface vers l'intérieur même de la gouttelette lipidique où ils s'accumulent.

(3) Enfin, selon l'hypothèse de l'« auto-agrégation », la chute brutale de l'activité antioxydante pour les esters à longue chaîne alkyle, serait due à la formation d'agrégats ou de micelles (éventuellement mixtes avec l'émulsifiant) en raison de la très faible CMC de ces esters. Deux conséquences : le maintien ou le retour (micelles mixtes avec l'émulsifiant) des esters dans la phase aqueuse et la réduction de la diffusion de ces structures avec finalement une faible probabilité de contact avec l'interface et les espèces oxydantes. Ce dernier point montre que les hypothèses d'auto-agrégation et de mobilité réduite ne sont pas en opposition mais plutôt complémentaires.

S'il est vraisemblable que la réalité procède de mécanismes en relation avec les trois hypothèses citées plus haut, il est intéressant de constater que le test CAT constitue un outil de screening moléculaire simple et robuste préfigurant le comportement des phénolipides dans des systèmes plus complexes et notamment les milieux vivants. En effet, cet « effet de seuil » de la capacité antioxydante en fonction de l'hydrophobie, a pu être observé également dans d'autres systèmes faisant intervenir des interfaces ou des membranes lipidiques tels les suspensions de liposomes (An *et al.*, 2011; Kikuzaki *et al.*, 2002; Panya *et al.*, 2010), ou les milieux cellulaires (Bayrasy *et al.*, 2013; Bernini *et al.*, 2012; Durand *et al.*, 2015; Laguerre *et al.*, 2011), avec des LCC égales ou proches de celles déterminées en émulsion pour une même série de phénolipides. Notons enfin que le terme « cut-off effect » a été employé dès les années 1930 en biologie et microbiologie pour qualifier le comportement non-linéaire d'activités très diverses (autres que l'activité antioxydante) à chaque fois qu'une famille d'homologues structuraux différant par la longueur de la chaîne carbonée était étudiée (Balgavý and Devínsky, 1996). Cet « effet de seuil » n'étant donc pas spécifique à l'activité antioxydante [Suriyarak *et al.* (2013, 2014) ont d'ailleurs montré par exemple qu'il était également associé à l'activité antimicrobienne de la série des rosmarinales d'alkyles] tout porte à croire qu'il s'agit d'un phénomène universel caractéristique des systèmes lipidiques compartimentalisés.

6.4. EFFET DE LA LIPOPHILISATION DES ACIDES PHENOLIQUES SUR LEUR CAPACITE ANTIRADICALAIRE EN MILIEU HOMOGENE.

La technique la plus couramment employée pour réaliser ce type de détermination est la

méthode DPPH décrite brièvement en **section 6.1**. Par cette méthode, l'effet de la lipophilisation a été déterminé pour plusieurs familles de phénolipides de synthèse. Par exemple, Gaspar *et al.* (2010) ont réalisé la synthèse des esters d'acide sinapique avec des alcools aliphatiques contenant entre 1 et 4 atomes de carbone. Leurs résultats obtenus par le test de DPPH[•] ont montré une diminution de 56% de la capacité antiradicalaire de l'acide sinapique ($EC_{50} = 32,2 \pm 6,2 \mu\text{M}$) lorsqu'il était estérifié ($EC_{50} = 50,1 \pm 3,8 \mu\text{M}$ pour le sinapate de butyle). De même, Szydłowska-Czerniak *et al.* (2018) ont montré la perte d'activité antioxydante de différents acides phénoliques (acide sinapique, caféique et férulique) après avoir été estérifiés avec de l'octanol. Les résultats obtenus dans cette étude sont illustrés dans le Tableau 10.

Finalement, d'autres études ont montré aussi la perte de la capacité à capter des radicaux libres de l'acide férulique ou de l'acide caféique après lipophilisation avec des chaînes alkyles allant de 1 à 18 atomes de carbone (Sørensen *et al.*, 2015).

Antioxydant	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Acide caféique	$12,14 \pm 0,03$
Caféate d'octyle	$35,87 \pm 0,11$
Acide sinapique	$23,83 \pm 0,06$
Sinapate d'octyle	$51,65 \pm 0,92$
Acide férulique	$31,36 \pm 19,27$
Férulate d'octyle	$52,24 \pm 2,61$

Tableau 10 : Capacité antiradicalaire de différents acides phénoliques et leur ester correspondant avec l'octanol (Szydłowska-Czerniak *et al.*, 2018).

En revanche, des études ont montré que la capacité antiradicalaire de certains acides phénoliques pouvait être améliorée après lipophilisation. L'étude réalisée par López-Giraldo *et al.*, (2009) a montré que l'estérification de l'acide chlorogénique avec différents alcool aliphatiques contenant entre 1 et 20 carbones avait un effet positif sur sa capacité antiradicalaire. Dans cette étude, ils ont calculé pour chaque composé la stœchiométrie n^{ei} qui correspond à la quantité d'espèces radicalaires DPPH[•] réduites par molécule d'antioxydant pendant les premiers instants de la réaction (après 2 min, Tableau 11). En outre, ils ont également calculé pour chaque composé la

stœchiométrie n^{es} qui correspond à la quantité d'espèces radicalaires DPPH• réduites par molécule d'antioxydant à l'état stationnaire (après 6 h de réaction avec le DPPH•, Tableau 11).

Dans un premier temps, l'acide chlorogénique semblerait avoir une capacité antiradicalaire supérieure par rapport aux phénolipides pendant les premiers instants de la réaction. Par contre, à l'état stationnaire, les auteurs ont montré qu'une molécule d'acide chlorogénique était capable de réduire environ cinq molécules de DPPH• et que ses esters étaient capables de réduire entre 6 et 8 molécules de DPPH• par molécule de composé.

Composé	n^{ei} (mol DPPH•/mol d'AOx)	n^{es} (mol DPPH•/mol d'AOx)
Acide chlorogénique	1,81 ± 0,11	4,88 ± 0,48
Chlorogénate de méthyle	1,36 ± 0,09	6,25 ± 0,2
Chlorogénate de butyle	1,40 ± 0,12	8,21 ± 0,40
Chlorogénate d'octyle	1,46 ± 0,03	8,52 ± 0,08
Chlorogénate de dodécyle	1,49 ± 0,05	6,64 ± 0,13
Chlorogénate d'hexadécyle	1,32 ± 0,08	6,33 ± 0,16
Chlorogénate d'octadécyle	1,85 ± 0,34	6,70 ± 0,21
Chlorogénate d'eicosyle	1,42 ± 0,16	6,17 ± 0,08

Tableau 11 : Paramètres antiradicalaires de l'acide chlorogénique et ses esters, aux premiers instants (n^{ei}) et à l'état stationnaire (n^{es}). Note : AOx : antioxydant. (López-Giraldo *et al.*, 2009).

Or, l'acide chlorogénique et ses esters possèdent uniquement deux groupements hydroxyles responsables de leur capacité à piéger les radicaux libres rendant ainsi les résultats obtenus incohérents. Pour expliquer ce phénomène, les auteurs ont suggéré la possibilité de régénération d'espèces antioxydantes dans le milieu réactionnel pendant la réaction entre le DPPH• et les composés phénoliques. Ils avancent que le méthanol présent dans le milieu (utilisé pour solubiliser les antioxydants et le DPPH•) pourrait réaliser des attaques nucléophiles sur les produits d'oxydation (*o*-quinones monomériques ou dimériques) permettant ainsi la régénération d'espèces antioxydantes et l'augmentation de la stœchiométrie n^{es} .

Au vu des résultats contradictoires de ces différentes études, il est difficile de généraliser à propos de l'effet de la lipophilisation sur la capacité à piéger des radicaux libres. En effet, chaque famille de phénolipides constitue un cas à part, puisque la structure propre à chaque molécule peut avoir

une influence sur les effets mésomères, inductifs et stériques et influencer de façon positive ou négative sur son activité antioxydante.

7. CONCLUSIONS ET OBJECTIFS

Au regard de cette partie bibliographique, la séparation de la fraction phénolique des tourteaux de colza et de tournesol pourrait permettre une double valorisation de ces matières premières agricoles. Dans un premier temps, cela permettrait d'améliorer la qualité nutritionnelle des tourteaux et, dans un deuxième temps, la fraction phénolique pourrait être valorisée (avant ou après fonctionnalisation) en fonction de ses propriétés bioactives et physico-chimiques (antioxydantes, anti-UV, ...).

Pour atteindre ce double objectif, ce travail de thèse s'est focalisé sur la bioraffinerie des tourteaux de colza et de tournesol pour la valorisation des composés phénoliques (en tant qu'antioxydants, avant ou après fonctionnalisation) tout en essayant de préserver l'intégrité des autres molécules d'intérêts. Ainsi, la démarche scientifique adoptée a été la suivante :

- (i) Pour commencer, nous avons fait la caractérisation chimique (en termes de composés phénoliques individuels et totaux, protéines, lignine, etc.) de nos différentes matières premières : coques, pellicules et tourteaux ayant subi différents traitements thermiques,
- (ii) Puis, nous nous sommes intéressés aux procédés de séparation des composés phénoliques des tourteaux de colza et de tournesol. Pour commencer, nous avons réalisé l'étude du fractionnement par voie sèche de ces tourteaux. Puis, pour terminer, nous avons testé l'utilisation de différents mélanges hydro-alcooliques pour l'extraction de ces composés phénoliques.
- (iii) Dans un troisième temps, nous avons étudié l'hydrolyse enzymatique des tourteaux de colza et de tournesol avec différentes cinnamoyl estérases pour la production d'acides sinapique et caféique, au travers d'une collaboration avec Anne Lomascolo (UMR1163 Biodiversité et Biotechnologie Fongiques, INRA, Aix Marseille Université, Marseille), spécialiste de la production et de l'utilisation de cinnamoyl estérases recombinantes d'*A. niger*.

- (iv) Pour finir, nous avons réalisé la lipophilisation des acides sinapique et caféique afin de moduler leur balance hydrophile/hydrophobe et améliorer leur capacité antioxydante. Nous avons ainsi synthétisé des mono- et di-esters de ces acides phénoliques avec différents α,ω -diols aliphatiques comportant 2 à 12 carbones et évalué de leur capacité antioxydante en milieu émulsionné et en milieu homogène.

CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES

1. MATERIELS

1.1. RÉACTIFS

Les produits suivants ont été achetés chez Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) : acide 5-caféoylquinique (chlorogénique) (95%), acide caféique (>98%), méthanol et eau pour HPLC (>99,9%), hydroxyde de sodium (97%), sulfate de sodium (99%), huile de Tung extraite de graines de *Aleurites fordii* (MM moyenne = 872 g.mol⁻¹), solution de tampon phosphate pH 7,2 (PBS), Brij 35 (MM estimé = 1198 g.mol⁻¹), 2,2'-Azobis(2-méthylpropanionamidine)dihydrochloride (AAPH), acide (±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchromane-2-carboxylique (Trolox), DPPH^{*} (radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl libre), éthylène glycol (99,8%), 1,4-butanediol (99%), 1,8-octanediol (99%), 1,12-dodécanediol (99%), 2-propanol (99,9%), bicarbonate de sodium (>99,9%), triphénylphosphine (TPP) (>99%) et diisopropyl azodicarboxylate (DIAD) (98%). Les produits suivants ont été achetés chez Honeywell (Mauguio, France) : éthanol (>99,8%), toluène (>99,9%), acétate d'éthyle (>99,5%) et tétrahydrofurane (THF) (>99,9%). L'acide sulfurique (96%) a été acheté chez Carlo ERBA Reagents (Val de Reuil, France). L'acide sinapique (99,9%, HPLC) a été synthétisé d'après la méthode décrite par Van Schijndel *et al.* (2017). Le thiocyanate de sinapine (99,0%, HPLC) a été isolé d'après la méthode décrite par Mailer (2008). Les acides 3,4- ; 3,5- ; et 4,5-di-O-caféoylquinique (>99,0%) ont été isolés à partir de feuilles de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) d'après la méthode décrite par Tong *et al.* (2015). Le tampon MOPS (acide 3-morpholino-1-propanesulfonique) ainsi que les enzymes recombinantes d'*Aspergillus niger* (AnFaeA, AnFaeB, ChIE) ont été gracieusement fournies par l'UMR1163 Biodiversité et Biotechnologie Fongiques, INRA, Aix Marseille Université, Marseille.

1.2. MATIÈRES PREMIÈRES

Toutes les matières premières à base de colza et de tournesol (notamment graines, tourteaux, coques et pellicules), issues ou non de procédés de trituration à l'échelle industrielle ou pilote, ont été fournis par les sociétés OLEAD et Terres Inovia, respectivement Plateforme Technologique

et Institut Technique de référence de l'interprofession française des huiles et protéines végétales. Toutes les matières premières sont issues des mêmes lot de graines.

2. METHODES

2.1. METHODES CHROMATOGRAPHIQUES ANALYTIQUES ET PREPARATIVES

2.1.1. Analyses par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

Les composés phénoliques sont analysés par HPLC à l'aide d'un système XR UFL Shimadzu LC-20AD équipé d'un détecteur UV-Vis SPD-M20A (Kyoto, Japon). Les extraits sont solubilisés dans un mélange MeOH/H₂O (2:1) avant analyse. Le volume d'injection est de 20 µL, le débit de 1mL/min et la température de la colonne fixée à 30°C. La séparation est effectuée sur une colonne en phase inverse C18 Kinetex (100Å, 5µm, 250 x 4,6 mm, Phenomenex, Le Pecq, France). L'élution est réalisée grâce à un mélange d'eau à 0,1% (v/v) d'acide acétique (A) et de méthanol à 0,1% (v/v) d'acide acétique (B), selon le gradient suivant : 15% B (0-5 min), 15-80% B (5-30) min, 80-100% B (30-31 min), 100% B (31-35 min), 100-15 % B (35-40 min). Le pilotage du système chromatographique ainsi que l'acquisition et le traitement des données sont assurés par le logiciel Shimadzu Labsolutions.

2.1.1.1. Détermination des teneurs en composés phénoliques individuels et totaux dans les échantillons de colza

L'acide sinapique et le thiocyanate de sinapine ont été choisis comme standards externes pour la réalisation des courbes de calibration. Les longueurs d'onde maximales d'absorption de l'acide sinapique et du thiocyanate de sinapine sont respectivement 323 nm (t_r = 17,8 min) et 328 nm (t_r = 11,5 min). La teneur en composés phénoliques totaux est calculée en tenant compte de l'aire totale des pics de l'acide sinapique et de tous ses esters à 328 nm et exprimée en mg d'équivalent d'acide sinapique (EAS).g⁻¹ MSD (matière sèche délipidée). Les courbes d'étalonnages sont obtenues à partir de solutions méthanoliques de concentration allant de 12,5 à 200 µmol/L, avec R^2 = 0,9987 pour l'acide sinapique et R^2 = 0,9983 pour le thiocyanate de sinapine. Les teneurs en composés phénoliques, données sous forme de moyenne ± écart-type (ET), sont calculées à partir de l'analyse des extraits issus de trois prises d'essai indépendantes.

2.1.1.2. Détermination des teneurs en composés phénoliques individuels et totaux des échantillons de tournesol

Les longueurs d'onde maximales d'absorption déterminées par spectrophotométrie sont : 323 nm pour l'acide caféique, 326 nm pour les acides 3-, 4-, 5-caféoylquinique, 328 nm pour les acides 3,5- et 4,5-di-caféoylquinique et 326 nm pour l'acide 3,4-di-caféoylquinique. Les temps de rétention sont de 12,1 min pour les acides 4- et 5- caféoylquinique (co-élus), 17,8 min pour l'acide 3,5-di-caféoylquinique et 21,3 min pour l'acide 4,5-di-caféoylquinique.

La teneur en composés phénoliques totaux est calculée en tenant compte de l'aire totale des pics de l'acide chlorogénique et de tous ses esters à 326 nm et exprimée en mg d'équivalent d'acide chlorogénique (EAC).g⁻¹ MSD (matière sèche délipidée). Par ailleurs, la teneur en Dérivés d'Acide Caféique Totaux (DACT) est calculée en tenant compte de l'aire totale des pics de tous les esters d'acide caféique à 323 nm et exprimée en mg d'équivalent d'acide caféique (EACa).g⁻¹ MSD. Les courbes d'étalonnages sont obtenues à partir de solutions méthanoliques de standards de concentration allant de 12,5 à 800 µmol/L avec R² = 0,9991 pour l'acide chlorogénique et R² = 0,9999 pour l'acide caféique.

2.1.2. Caractérisation par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) des principaux composés phénoliques dans les extraits méthanoliques de tourteaux de colza et tournesol.

Les extraits méthanoliques des tourteaux de colza et de tournesol ont été analysés par LC-MS en utilisant un système UPLC Acquity H-Class (waters) équipé d'un détecteur UV-Vis à barrette de diodes. La séparation est réalisée sur une colonne Kinetex C18 (100Å, 2,6 µm, 30 x 2,1 mm ; Phenomenex, Le Pecq, France). Le volume d'injection, le débit et la température de la colonne sont fixés respectivement à 1µL, 0,5 mL.min⁻¹ et 25°C. Le gradient d'élution est réalisé en utilisant de l'eau HPLC à 0,1 % (v/v) d'acide formique (solvant A) et du méthanol HPLC à 0,1 % (v/v) d'acide formique (solvant B) dans les mêmes conditions que celles décrites en **section 2.1.1**. Le spectrophotomètre couplé à la chaîne chromatographique est un Synapt G2-S (waters) équipé d'une source d'ionisation par électro nébulisation (ESI) paramétrée comme suit : tension

capillaire 3 000 V, tension du cône 30 V, température de la source 140°C et température de désolvatation 450 °C. L'analyse des ions formés a été réalisée en modes positif et négatif.

2.1.3. Purification des produits d'estérification des acides sinapique et caféique avec les diols par chromatographie flash sur gel de silice

Les milieux réactionnels des mono- et di-esters des acides phénoliques traités dans la **section 2.7.** ont été fractionnés par chromatographie flash en utilisant un système de type Reveleris X2 (Butchi, Switzerland).

La séparation est réalisée sur une colonne de gel de silice en phase normale (RediSep, technologies Serlabo, France) de 40 g avec un volume de colonne CV = 48 mL et un débit de 40 mL/min. Le gradient d'élution utilisé est un mélange (v/v) de toluène et d'acétate d'éthyle (0 à 100% d'acétate d'éthyle en 25 min). L'élution est suivie par UV à 328 nm. Les fractions correspondantes au produit sont collectées dans un ballon et le solvant est évaporé sous vide à 55 °C.

Tous les mono-esters et di-esters sont obtenus sous forme de poudre blanche (sauf pour les di-esters d'acide sinapique avec n = 4 et n = 8 qui ont respectivement une couleur rose et jaune) de pureté >95 % (RMN) après séchage sous vide pendant 2 jours à température ambiante.

2.1.4. Analyses par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été obtenus par un spectromètre Bruker 500 MHz Avance III (Bremen, Allemagne) équipé d'une crysonde hélium de type BBFO (large bande) à une température de 298K et fonctionnant à 500 MHz. Les composés sont dilués dans du DMSO deutéré (DMSO- d_6) et les déplacements chimiques sont exprimés par rapport au DMSO- d_6 à 2,5 ppm et 39,5 ppm pour ^1H et ^{13}C respectivement. La structure des différents produits est déterminée à partir des spectres RMN 1D et 2D mononucléaire et hétéronucléaire.

Dans le cadre de la détermination de la pureté, la technique ERETIC a été mise en œuvre afin d'éviter le recours à un étalon interne. La pureté des composés a été mesurée en utilisant comme référence externe l'acide HABA (acide 2,4-hydroxyphenylazobenzoïque) de concentration

connue. Les spectres ^1H quantitatifs ont été obtenus grâce à la séquence d'impulsion "zg" dont le délai de relaxation d_1 a été fixé à 6s. Les données ont été traitées à l'aide du logiciel Topspin 3.5.

2.2. PREPARATION DES TOURTEAUX DE COLZA ET TOURNESOL INDUSTRIELS ET NON-INDUSTRIELS

2.2.1. Préparation du tourteau de colza non-industriel

Les graines entières de colza (120 kg) sont d'abord pressées à froid avec une presse à vis de type MBU20 (OLEXA, France) dont le débit d'alimentation est fixé à 75kg/h, pour éliminer 75 % de la quantité d'huile initiale. L'huile résiduelle du gâteau pressé est ensuite extraite avec de l'hexane à 50°C sous agitation dans un appareil pilote de filtration et séchage (Guedu Pilot Agitated Filter Dryer, De Dietrich Process Systems) d'une capacité totale de 480 L.

L'extraction est réalisée sur 73 kg de gâteau pressé par immersion dans l'hexane pendant 15 min, suivie d'une étape de filtration. Cinq étapes successives d'immersion-filtrage sont nécessaires pour éliminer l'huile du gâteau. Le tourteau est finalement désolvanté sous vide à 60°C dans le même appareil. Les teneurs (base sèche) en eau et en lipides du tourteau final sont de $11,0 \pm 0,0\%$ et $1,7 \pm 0,1\%$ respectivement.

2.2.2. Préparation du tourteau de tournesol non-industriel

Les graines entières de tournesol (75 kg) sont d'abord pressées à froid et transformées en écailles à l'aide d'un écailleur (Damman-Croes N.V., Belgique). L'huile résiduelle des écailles est ensuite extraite avec de l'hexane à 50°C sous agitation dans le même appareil de filtration et séchage décrit précédemment. L'extraction, réalisée sur 73 kg d'écailles par immersion dans l'hexane pendant 15 min, est suivie d'une étape de filtration. Cinq étapes successives d'immersion-filtrage sont ainsi réalisées avant la désolvantation sous vide à 60°C dans le même appareil. Les teneurs finales en eau et en lipides sont respectivement de $7,5 \pm 0,0\%$ et $2,0 \pm 0,1\%$ (base sèche).

2.2.3. PREPARATION DE TOURTEAUX INDUSTRIELS DE COLZA ET DE TOURNESOL

On entend ici par « tourteaux industriels », des tourteaux obtenus à l'échelle industrielle et ayant subi durant le procédé de trituration un traitement thermique après l'étape de désolvantation :

les tourteaux sont pré-chauffés à 80°C puis portés à $107 \pm 2^\circ\text{C}$, et maintenus à cette température pendant 80 ± 5 min. Les teneurs en eau et en lipides (base sèche) sont respectivement de $10,0 \pm 0,0\%$ et $1,5 \pm 0,1\%$, pour le tourteau industriel de colza et respectivement de $10,5 \pm 0,0\%$ et $1,9 \pm 0,1\%$, pour le tourteau industriel de tournesol.

2.3. PROCÉDES DE FRACTIONNEMENT PAR VOIE SÈCHE DES TOURTEAUX NON INDUSTRIELS DE COLZA ET TOURNESOL

2.3.1. Broyage ultra-fin

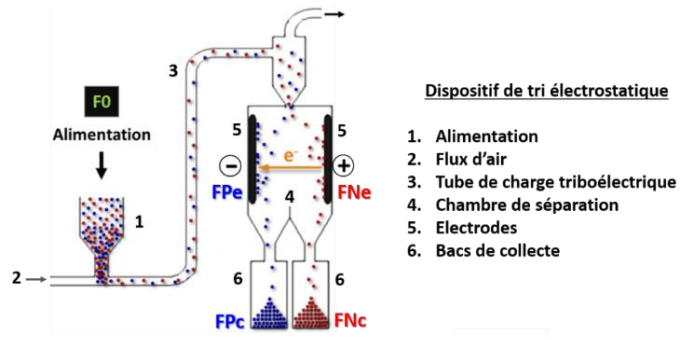
Les tourteaux sont préalablement broyés de façon grossière avec un broyeur à couteaux de type Retsch SM 300 (Restch Technology GmbH, Haan, Germany) opérant à 2000 tpm avec une grille à pores de 2 millimètres. Les échantillons sont ensuite finement divisés par impact et cisaillement à l'aide d'un appareil de type UPZ100 (Hosokawa-alpine, Augsburg, Germany) équipé de grilles à pores de 0,5 ; 0,3 et 0,1 mm (0,2 mm pour le tourteau de tournesol). Le broyeur est utilisé à température ambiante, à une vitesse de rotation de 18 000 tpm et à un débit d'alimentation de 4 kg.h^{-1} . Le broyage est terminé lorsque toute la prise d'essai est passée à travers la grille. Les broyages sont réalisés en triplicat pour chaque matière première.

2.3.2. Détermination de la distribution moyenne des tailles de particules

La distribution de tailles des particules des différents échantillons broyés est mesurée par diffraction laser à température ambiante à l'aide d'un appareil de type Mastersizer 2000 associé à un appareil de dispersion par voie sèche de type Scirocco 2000 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Pour chaque détermination, 10 g de produit sont introduits dans l'alimentation de l'appareil. Le taux de vibration de l'alimentation est fixé à 40% avec une pression de dispersion d'air fixé à 3 bars et l'indice de réfraction des particules à 1,53. Après analyse, la fraction volumique (en %) de l'échantillon est exprimée en fonction de la taille des particules (en μm). Enfin, la taille moyenne des particules (ou D_{50}) est déterminée comme le diamètre équivalent pour lequel la valeur de la distribution cumulée est de 50 %. Les analyses sont réalisées en triplicat pour chaque matière première.

2.3.3. Tri électrostatique

Le fractionnement des différents tourteaux de colza et tournesol obtenus à l'étape précédente (**section 2.3.1**) a été réalisée dans un séparateur électrostatique pilote TEP System (Tribo Flow Separations, Lexington, USA) dont le principe de fonctionnement est donné dans le schéma ci-dessous :

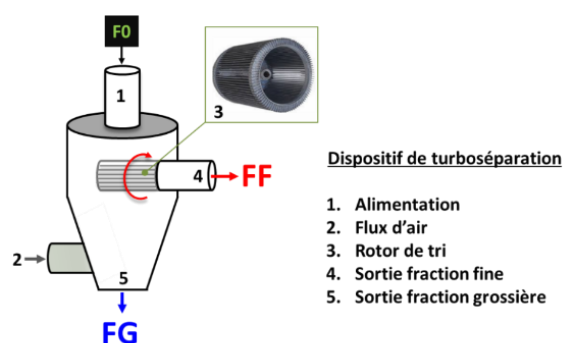


Une prise d'essai **F0** (fraction initiale), de l'ordre de 250 g, est introduite dans le séparateur par un dispositif d'alimentation **1** opérant à un débit de $1,2 \text{ kg.h}^{-1}$. Les particules sont entraînées par un flux d'air **2** (débit = $5,1 \text{ m}^3.\text{h}^{-1}$) à travers un tube en téflon **3** (250 cm, $\varnothing_{\text{int}} = 11 \text{ mm}$, $\varnothing_{\text{ext}} = 13 \text{ mm}$) dans lequel elles sont chargées par triboélectricité, c'est-à-dire, par frottements contre les parois du tube ou entre elles. En sortie de tube, les particules chargées sont dirigées vers une chambre de séparation **4** contenant deux électrodes **5** (7,5 cm x 28,0 cm) espacées de 3.8 cm et soumises à une tension de 10 000 V, où les particules chargées positivement sont attirées par l'électrode négative et les particules chargées négativement par l'électrode positive. Les particules ainsi déviées sont récupérées dans des bacs de collecte **6** sous forme de deux fractions séparées : l'une constituée des particules chargées positivement et nommée fraction positive de collecte **FPc**, l'autre contenant les particules chargées négativement et nommée fraction négative de collecte **FNc**. Les particules agglomérées sur les électrodes sont récupérées manuellement et considérées comme les fractions les plus pures : les particules chargées positivement et présentes sur l'électrode négative constituent la fraction positive de l'électrode **FPe**. A l'inverse, les particules chargées négativement (sur l'électrode positive) représentent la fraction négative de l'électrode **FNe**. Pour éviter les phénomènes d'agglomération et de saturation des électrodes, les particules sont récupérées toutes les deux minutes environ. Les quatre fractions ainsi générées

par tri électrostatique (FPc, FNe, FPc, FNe) sont conservées sous atmosphère inerte à 4°C en attendant leur caractérisation physico-chimique. Chaque séparation fait l'objet de trois répétitions.

2.3.4. TURBO-SÉPARATION

La turbo-séparation, ou classification par air, a été utilisée pour séparer les particules en fonction de leur taille et de leur densité et générer une fraction grossière (**FG**) et une fraction fine (**FF**) selon le principe résumé dans le schéma suivant :



Dans notre étude, l'équipement pilote basé sur le turbo séparateur ATP 50 de la société Hosokawa-Alpine (Osaka, Japon), est utilisé comme décrit par Chuetor *et al.* (2015). Brièvement, le système **1** est alimenté avec une prise d'essai **F0** de 250g, à un débit de 1kg.h⁻¹. Les particules sont entraînées par un flux d'air **2** au débit de 100 m³.h⁻¹ vers le rotor de tri **3** équipé d'une grille à 250µm et tournant à une vitesse allant de 3000 à 7000 tpm. Les fractions fine (**FF**) et grossière (**FG**) ainsi générées sont conservées sous atmosphère inerte à 4°C en attendant leur caractérisation physico-chimique. Chaque séparation fait l'objet de trois répétitions.

2.4. CARACTERISATIONS PHYSICO-CHIMIQUES DES FRACTIONS ISSUES DU FRACTIONNEMENT PAR VOIE SECHE.

2.4.1. Extraction des composés phénoliques de colza et tournesol

L'extraction de composés phénoliques, des échantillons issus du broyage ultrafin et/ou après fractionnement, est effectuée comme décrit en **section 2.5.**, en utilisant le méthanol pur comme solvant de référence. L'extraction est réalisée en triplicat sur des prises d'essai indépendantes.

2.4.2. Teneur en eau

Dans une capsule en aluminium, sèche et préalablement tarée (M1), sont pesés environ 2 g d'échantillon (M2). La capsule contenant l'échantillon est maintenue dans une étuve à 130 °C pendant 2 h. A la fin de cette période, la capsule est mise à refroidir dans un dessiccateur pendant 30 min puis pesée (M3).

La teneur en eau, exprimée en pourcentage (%) de la masse initiale d'échantillon, est alors déterminée selon l'équation (1) comme suit :

$$\text{Teneur en eau (\%)} = \frac{(M2 - M3).100}{M2 - M1} \quad (1)$$

M1 = masse de la capsule sèche (g)

M2 = masse de l'échantillon avant dessiccation (g)

M3 = masse de l'échantillon sec + capsule sèche (g)

La teneur en eau est réalisée en triplicat.

2.4.3. Teneur en cendres

Dans une nacelle à incinération, sèche et préalablement tarée (M1), sont pesés environ 2 g d'échantillon (M2). La nacelle contenant l'échantillon est maintenue dans une étuve à 900 °C pendant 2 h, puis est refroidie pendant 5 min sur la porte du four afin d'éviter le choc thermique. Enfin, la nacelle, est mise à refroidir dans un dessiccateur pendant 30 min puis pesée (M3).

Les teneurs en cendres sur matière humide (% MH), puis sur matière sèche (% MS), sont alors calculées respectivement selon les équations (2) et (3) de la façon suivante :

$$\text{Teneur en cendres (\% MHD)} = \frac{(M2 - M3).100}{M2 - M1} \quad (2)$$

$$\text{Teneur en cendres (\% MSD)} = \frac{(\% \text{ MH}).100}{100 - \% \text{ eau}} \quad (3)$$

Où :

M1 (g) = masse de la nacelle vide

M2 (g) = masse de la prise d'essai délipidée

M3 (g) = masse de la nacelle et de l'échantillon après incinération de 2 heures à 900°C

%eau = teneur en eau déterminée en **2.4.2**

La teneur en cendres est réalisée en triplicat.

2.4.4. Teneur en protéines

La teneur en protéines (% MS), a été déterminée par la méthode de Kjeldhal selon la norme NF EN ISO 03-050 (AFNOR, 1970). La détermination est réalisée en triplicat.

2.4.5. Teneur en huile

La méthode décrite ci-dessous permet de déterminer simultanément la teneur en huile de plusieurs échantillons, et ceci en triplicat :

Par échantillon, trois enveloppes de papier-filtre préalablement séchées et pesées et contenant chacune une prise d'essai d'environ deux grammes (pesés exactement) sont déshydratées dans un four à 105 °C jusqu'à masse constante. Les enveloppes sont ensuite placées dans appareil de Soxhlet et extraites à l'hexane pendant 8h. Après extraction, les enveloppes sont désolvantées sous hotte à température ambiante pendant 12 h, puis séchées à 105 °C, refroidie en dessiccateur et finalement pesées. La teneur en huile est calculée à partir de la différence entre le poids sec de l'échantillon (tourteau et enveloppe) avant et après délipidation de la façon suivante :

$$\text{Teneur en huile (\%MS)} = 100 \times \frac{(SP-SPD)}{SP-SV} \quad (4)$$

Où :

SV (g) = masse du sachet vide sec

SP (g) = masse du sachet plein sec

SPD (g) = masse du sachet plein délipidé

Les valeurs sont données en pourcentage d'huile par gramme de matière sèche.

2.4.6. Teneur en lignine

La teneur en lignine est déterminée par la méthode de Klason. Brièvement, 80 mg de chaque échantillon sont hydrolysés pendant 1 h à 30 °C avec de l'acide sulfurique à 72 %. Les solutions sont ensuite diluées avec de l'eau jusqu'à obtenir une solution finale à 4% d'acide sulfurique, puis

chauffées à 120 °C pendant 65 min. Les hydrolysats sont filtrés sur un creuset de granulométrie de 10 µm et la lignine de Klason est calculée en fonction du poids du résidu retenu par le creuset après séchage à 105°C pendant 24 h. La teneur en lignine est alors calculée comme suit :

$$\text{Teneur en lignine (\%MSD)} = \frac{[(MCE - MC) \times 100]}{M_{\text{initial}}} - (3) \quad (5)$$

Où :

MCE (g) = masse du creuset et de l'échantillon à 105°C

MC (g) = masse du creuset vide sec

M_{initial} (g) = masse initiale de l'échantillon sec délipidé

(3) = teneur en cendres (%MSD)

Toutes les déterminations sont réalisées en triplicat.

2.4.7. Microscopie électronique à balayage (MEB)

L'observation des fractions ultra-fines de colza et tournesol a été réalisée à l'aide d'un microscope électronique à balayage de paillasse (MEB) (modèle Phenom ProX, Phenom-World BV, Eindhoven, Netherlands). Les poudres sont d'abord saupoudrées sur un scotch carbone double-face. L'excès de particules est éliminé avec un jet d'air comprimé. Les échantillons sont observés directement, sans métallisation, et les images acquises avec un détecteur d'électrons rétrodiffusés. Les paramètres d'observation fixés sont les suivants : tension d'accélération 10kV, mode Image. Les images de 1024x1024 pixels sont acquises avec une qualité haute, conduisant à une durée d'acquisition de 3s. Les agrandissements sont utilisés dans une gamme de 30 µm à 200 µm.

2.4.8. Analyses statistiques

Les moyennes et écarts-types sont calculés avec le logiciel Minitab Statistical Software V.18. Les moyennes sont comparées avec une analyse unidirectionnelle de variance (ANOVA). Le niveau α de signification de l'analyse statistique est fixé à 0,05.

2.5. METHODOLOGIE D'EXTRACTION DES COMPOSES PHENOLIQUES

L'extraction des composés phénoliques est réalisée en suivant le procédé décrit par Cai and Arntfield (2001) en utilisant un rapport solvant/échantillon de 100/1 (v/m). Brièvement, 50 mg de tourteau de colza ou de tournesol préalablement broyés finement, tel que décrit dans la **section 2.3.1.** (avec la grille à trous de 0,1 mm pour le tourteau de colza et 0,2 mm pour le tourteau de tournesol), sont pesés dans un flacon ambré avec bouchon à vis et 5 mL de chaque mélange hydro-alcoolique, présentés dans le Tableau 12, sont ajoutés individuellement par essai.

EtOH/H ₂ O (v/v)	100	95	90	85	80	75
iPrOH/H ₂ O (v/v)	100	95	90	85	80	75

Tableau 12 : Différentes concentrations en H₂O utilisées en fonction de chaque alcool pour l'extraction des composés phénoliques des tourteaux de colza et de tournesol.

Les flacons fermés sont maintenus sous agitation orbitale (350 tpm) à 75 °C pendant 20 min. Les flacons sont ensuite refroidis à température ambiante et centrifugés pendant 5 min à 4000 tpm. Le surnageant est filtré avec un filtre à 0,45 µm. Le solvant est finalement évaporé sous flux d'azote et les extraits secs conservés sous atmosphère inerte à 4°C.

2.6. TRAITEMENT ENZYMATIQUES DES TOURTEAUX INDUSTRIELS ET NON INDUSTRIELS DE COLZA ET DE TOURNESOL

2.6.1. Hydrolyse basique des tourteaux non industriels de colza et de tournesol et de ses extraits méthanoliques sec correspondants

A une suspension de 50 mg de tourteau (ou une suspension de l'extrait méthanolique sec issu de 50 mg de tourteau) dans 1,5 mL de MeOH, sont ajoutés 6 mL d'une solution NaOH 2N. Le mélange thermostaté à 30°C est agité à 350 tpm pendant 15, 30, 60 et 120 min. Après la durée d'hydrolyse considérée, le mélange est acidifié à pH 2 avec une solution HCl 4M. Ensuite, 1 mL du mélange est introduit dans un tube à essai avec 300 mg de NaCl sont ajoutés. Le mélange est alors lavé avec 2 mL d'acétate d'éthyle (AcOEt), centrifugé (3000 tpm, 5 min, température ambiante) et la phase organique récupérée. Cette étape d'extraction est répétée deux fois de plus. Les phases organiques sont mélangées et séchées sous flux d'azote. Le résidu sec est ensuite solubilisé avec

1 mL d'un mélange MeOH/H₂O (2:1) avant d'être analysé par HPLC. Trois répétitions indépendantes sont réalisées par expérience.

2.6.2. Optimisation de la concentration en enzyme pour l'hydrolyse enzymatique avec AnFaeB et ChIE des composés phénoliques du tourteau industriel de tournesol.

L'optimisation de la concentration en enzyme pour l'hydrolyse enzymatique du tourteau de tournesol industriel a été réalisée selon la méthode décrite par Odinet *et al.* (2017) avec quelques modifications. 50 mg de tourteau sont pesés dans un flacon ambré avec bouchon à vis et 5 mL de tampon MOPS (100 mM, pH 6) sont ajoutés. Le mélange est ensuite incubé à 50°C pendant 30 min sous agitation orbitale à 350 tpm. Après incubation, différentes quantités d'enzymes AnFaeB ou ChIE sont ajoutées dans le milieu (0, 5, 10, 20, 30 nkat/g de tourteau). Le mélange est agité à 150 tpm à une température de 50°C pendant des intervalles de temps différents (0, 1, 2, 3 et 4 heures). Le temps $t = 0$ correspondant à l'analyse du milieu réactionnel avant ajout de l'enzyme. En parallèle, des contrôles sans enzyme sont incubés dans les mêmes conditions. En fin d'hydrolyse, le mélange est refroidi à une température de -80°C et lyophilisé. Le lyophilisat est alors dissous dans 5 mL de MeOH et une extraction est réalisée selon les conditions décrites en **section 2.5**. La teneur en composé phénoliques totaux (CPT), nommée aussi teneur en dérivés d'acide caféiques totaux (DACT) est calculée comme décrit en **section 2.1.1.2** en tenant compte de l'aire totale des molécules contenant des unités caféoyles après normalisation (i.e. chaque aire de pic a été divisée par le nombre d'unités caféoyles contenues dans la molécule) et exprimée en μmol d'équivalent d'acide caféique par gramme de matière sèche délipidée EACa.g^{-1} MSD. Deux répétitions indépendantes sont réalisées par expérience.

2.6.3. Cinétique d'hydrolyse enzymatique des tourteaux non-industriels de colza et de tournesol et de ses extraits méthanoliques sec avec des esters carboxyliques estérases

L'hydrolyse enzymatique des tourteaux de colza et de tournesol non-industriels et de leurs extraits correspondants est réalisée tel que décrit dans la section **2.6.2.** avec quelques modifications : les différents paramètres (température, pH et concentration en enzyme) ont été fixés pour chaque échantillon tels qu'indiqués dans le Tableau 13.

		AnFaeA			AnFaeB			ChIE		
		T (°C)	pH	[C]*	T (°C)	pH	[C]**	T (°C)	pH	[C]*
Colza	Tourteau	55	5,5	39,2	-	-	-	-	-	-
	Extrait sec	55	5,5	39,2	-	-	-	-	-	-
		37	5,5	39,2	-	-	-	-	-	-
Tournesol	Tourteau	-	-	-	50	6,0	30	50	6,0	10
	Extrait sec	-	-	-	50	6,0	30	50	6,0	10
		-	-	-	37	6,0	30	37	6,0	10

Tableau 13 : Paramètres de l'hydrolyse enzymatique en fonction de la matière première employée et de l'enzyme testée. La température indiquée correspond à celles d'incubation et d'hydrolyse. *Concentration des enzymes exprimée en nkat/g de tourteau.

Brièvement, 50 mg de tourteau (ou d'extrait méthanolique sec issu de 50 mg de tourteau) sont introduits dans un flacon ambré avec bouchon à vis et 5 mL de tampon MOPS à 100 mM à des pH correspondants à chaque échantillon sont ajoutés. Le mélange est ensuite incubé à différentes températures en fonction de l'échantillon pendant 30 min sous agitation orbitale à 350 tpm.

Après incubation, l'enzyme correspondante à chaque essai est ajoutée au mélange dans les quantités indiquées dans le Tableau 13. Le mélange est alors agité à 350 tpm à la température d'incubation correspondante pendant des intervalles de temps différents (0, 10, 30, 60, 120 et 240 minutes). Le temps $t = 0$ correspondant à l'analyse du milieu réactionnel avant ajout de l'enzyme. En parallèle, des contrôles sans enzyme sont incubés dans les mêmes conditions. En fin d'hydrolyse, le mélange est refroidi à une température de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ puis lyophilisé. Le lyophilisat obtenu est dissous dans 5 mL de MeOH et une extraction est réalisée selon les conditions décrites en **section 2.5**. Pour les échantillons de colza, la teneur en DAST est déterminée comme décrit en **section 2.1.1.1**. D'autre part, la teneur en DACT des échantillons de tournesol est calculée comme décrit en **section 2.1.1.2**.

Pour terminer, en fin d'hydrolyse, un « **rendement global** » et un « **rendement spécifique** » sont calculés. Le « **rendement global** » est calculé en fonction de la quantité maximale d'acide phénolique libérée en fonction de la teneur en esters d'acides phénoliques initiale présente dans le tourteau, alors que le « **rendement spécifique** » est calculé en fonction de la teneur en esters d'acides phénoliques réellement présents dans le milieu. Deux répétitions indépendantes sont réalisées par expérience.

2.7. ESTERIFICATION DES ACIDES SINAPIQUE ET CAFEIQUE AVEC DIFFERENTS α,ω -DIOLS A CHAÎNE ALIPHATIQUE COMPORTANT (n= 2 A 12) ATOMES DE CARBONE

2.7.1. Mono-estérification en milieu fondu avec les α,ω -diols à n = 2, 4, 8 et 12

La mono-estérification chimique des acides sinapique (3,12 mmol) et caféique (3,89 mmol) est réalisée dans des flacons ambrés hermétiques contenant différents diols (éthylène glycol, 156,1 mmol ; 1,4-butanediol, 93,6 mmol ; 1,8-octanediol, 18,7 mmol et 1,12-dodécanediol, 18,7 mmol) en large excès (5 à 50 fois), de sorte qu'une fois fondus ils jouent à la fois le rôle de réactif et de solvant. De façon générale, le mélange constitué de l'acide phénolique et du diol est chauffé à 90°C sous agitation magnétique pendant 30 min jusqu'à dissolution des substrats et obtention d'une solution limpide. Une quantité d'acide sulfurique (18N, 96%) correspondant à 3 % (m/m) de la masse totale des différents réactifs (acide phénolique + diol), est alors introduite goutte à goutte dans le milieu pour catalyser la réaction à la même température (90°C). L'eau générée est éliminée par absorption sur du tamis moléculaire à 4Å (40 mg/mL) ajouté au milieu réactionnel. Afin de suivre l'avancement de la réaction, des prélèvements réguliers de 20 μ L sont dilués dans 980 μ L d'un mélange MeOH/H₂O (2/1, v/v) puis analysés par HPLC en phase inverse à 328 nm (voir **section 2.1.1.**). Après conversion totale de l'acide phénolique (environ 90 min), le mono-ester correspondant est purifié de la façon suivante :

- Mono-esters à courte chaîne (n= 2 et 4) : Le milieu réactionnel est mélangé à 50 mL d'acétate d'éthyle (AcOEt). La phase organique est alors lavée avec de l'eau ultra pure (50 mL x 2), puis séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée (0,45 μ m) et le solvant finalement évaporé sous vide. Le produit brut est solubilisé dans 3 mL d'AcOEt et le mélange est directement purifié par chromatographie flash.
- Mono-esters à long chaîne (n= 8 et 12) : les milieux réactionnels sont adsorbés sur de la silice pour constituer un dépôt solide qui est ensuite fractionné par chromatographie flash.

La purification par chromatographie flash est effectuée tel que décrit dans la **section 2.1.3.**

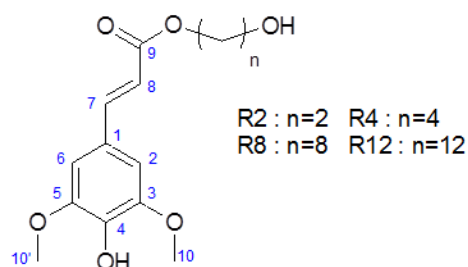


Figure 20 : Structure des mono-esters d'acide sinapique et différents α,ω -diols aliphatiques ($n = 2, 4, 8, 12$).

Tableau 14 : Données de RMN ^{13}C et ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) des mono-esters d'acide sinapique avec différents α,ω -diols aliphatiques ($n = 2, 4, 8$ et 12).

C	$(\delta/\text{ppm})^{13}\text{C}$			$(\delta/\text{ppm})^1\text{H}$				
	Type	R0	R2-R12	Type	R0	Multiplicité	R2-R12	Multiplicité
1	C	124,5	124,9	-	-	-	-	-
2-6	CH	106,0	106,9	2H	7,01	s^a	7,05	s^a
3-5	C	147,9	148,7	-	-	-	-	-
4	C	138,0	139,0	-	-	-	-	-
7	CH	144,7	145,8	1H	7,55	$d^a, J=16,1 \text{ Hz}$	7,59	$d^a, J=16,1 \text{ Hz}$
8	CH	116,0	115,5	1H	6,47	$d, J=16,1 \text{ Hz}$	6,56	$d, J=16,1 \text{ Hz}$
9	C=O	167,8	167,4	-	-	-	-	-
10-10'	OCH ₃	56,0	56,8	6H	3,82	s	3,81	s
$-\alpha\text{CH}_2-$	CH ₂	-	64,2-66,0	2H	-	-	4,13-4,15	$t^a, J=7,3 \text{ Hz}$ $t, J=4,9^b \text{ Hz}$
$-\beta\text{CH}_2-$	CH ₂	-	25,8-28,7 59,8 ^b	2H	-	-	1,64-1,68 3,63 ^b	m^a $t, J=4,9^b \text{ Hz}$
$-\text{CH}_2-$	CH ₂	-	29,3-33	$x\text{H}^c$	-	-	1,27-1,52	m
$-\text{CH}_2\text{OH}$	-	-	60,9-61,1	-	-	-	3,39-3,45	-

^a s = singulet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet.

^b Donnés pour le mono-ester à $n = 2$.

^c $x = 2(n-3)$ avec $n =$ le nombre total d'atomes de carbone de la chaîne alkyle.

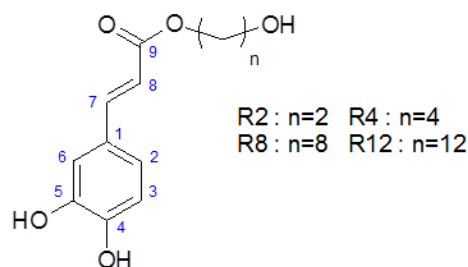


Figure 21 : Structure des mono-esters d'acide caféique et différents α,ω -diols aliphatiques ($n = 2, 4, 8, 12$).

Tableau 15 : Données de RMN ^{13}C et ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) des monoesters d'acide caféique avec différents α,ω -diols aliphatiques ($n = 2, 4, 8$ et 12).

C	$(\delta/\text{ppm})^{13}\text{C}$			$(\delta/\text{ppm})^1\text{H}$				
	Type	R0	R2-R12	Type	R0	Multiplicité	R2-R12	Multiplicité
1	C	125,5	125,7	-	-	-	-	-
2	CH	121,4	121,6	1H	7,00	-	7,00	dd ^a = 2,0 Hz; 8,3 Hz
3	CH	115,7	115,9	1H	6,75	-	6,77	d ^a = 8,3 Hz
4	C	149,1	149,2	-	-	-	-	-
5	C	146,0	146,1	-	-	-	-	-
6	CH	114,7	114,8	1H	7,03	-	7,05	d = 2,0 Hz
7	CH	145,5	145,6	1H	7,50	-	7,51	d = 16,2
8	CH	114,0	114,0	1H	6,25	-	6,27	d = 16,2
9	C=O	167,0	167,1	-	-	-	-	-
- $^{\alpha}\text{CH}_2$ -	CH ₂	-	64,2-66,2	2H	-	-	4,12-4,13	t ^a = 6,5 Hz t = 4,8 Hz ^b
- $^{\beta}\text{CH}_2$ -	CH ₂	-	25,7-28,7 59,6 ^b	2H	-	-	1,57-1,64 3,66 ^b	m ^a t = 4,8 Hz ^b
-CH ₂ -	CH ₂	-	29,3-29,5	$x\text{H}^c$	-	-	1,27-1,52	m
-CH ₂ OH	CH ₂	-					3,36-3,44	t = 7,0 Hz

^a dd = doublet de doublet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet.

^b Donnés pour le mono-ester à $n = 2$.

^c $x = 2(n-3)$ avec n = le nombre total d'atomes de carbone de la chaîne alkyle.

2.7.2. Di-estérification des mono-esters d'acide phénoliques par la réaction de Mitsunobu

La di-estérification chimique des mono-esters d'acide sinapique (1,34 mmol, 1 éq) ou d'acide caféique (1,67 mmol, 1 éq) est réalisée dans des flacons ambrés fermés hermétiquement et contenant de l'acide sinapique (1,34 mmol, 1 éq.) ou de l'acide caféique (1,67 mmol, 1 éq.) respectivement.

Le mélange est dissous dans 5 mL de THF anhydre, puis refroidi à 0-4°C. Un (1) équivalent de triphényl phosphine (PPh_3) est d'abord ajouté au mélange, puis 1 équivalent de diisopropyl azodicarboxylate (DIAD) est introduit goutte à goutte dans le milieu réactionnel. A la fin de l'ajout, le bain de glace est retiré et le mélange est agité (agitation orbitale, 350 tpm) à température ambiante pendant 24 h. Le THF est alors évaporé sous vide à 55 °C et le milieu est repris avec 50 mL d'AcOEt. Le milieu ensuite est lavé avec (i) une solution saturée de NaHCO_3 (50 mL x 2), puis (ii) une solution saturée de NaCl (50 mL x 2) et enfin (iii) de l'eau ultra pure (50 mL x 2). La phase

organique est ensuite séchée sur sulfate de sodium anhydre, puis évaporée à sec sous vide à 55 °C.

Finalement, le résidu est repris avec 3 mL d'AcOEt et purifié directement (pas de dépôt solide) par chromatographie flash, comme décrit précédemment pour les mono-esters (**section 2.1.3.**). Les fractions correspondant au produit sont collectées dans un ballon et le solvant est évaporé sous vide à 55 °C. Les di-esters sont obtenus sous formes de poudres (> 97 % RMN) après séchage sous vide pendant 2 jours à température ambiante.

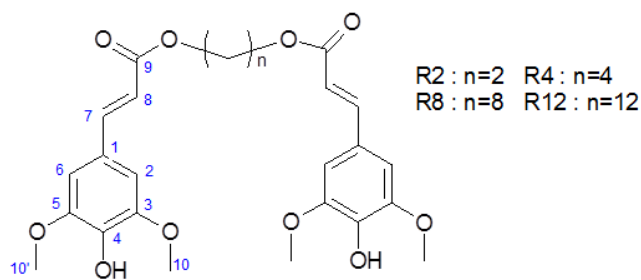


Figure 22 : Structure des di-esters d'acide sinapique avec différentes chaînes aliphatiques (n = 2, 4, 8, 12).

Tableau 16 : Données de RMN 13C et 1H (500 MHz, DMSO-d6) des diesters d'acide sinapique avec différents α,ω -diols aliphatiques (n = 2, 4, 8 et 12)

C	$(\delta/\text{ppm})^{13}\text{C}$		$(\delta/\text{ppm})^1\text{H}$		
	Type	R2-R12	Type	R2-R12	Multiplicité
1	C	124,8	-	-	-
2-6	CH	106,5	4H	7,05	s ^a
3-5	C	148,5	-	-	-
4	C	139,1	-	-	-
7	CH	146,3	2H	7,59	d ^a , J=15,4 Hz
8	CH	114,8	2H	6,59	d, J=15,4 Hz
9	C=O	167,2	-	-	-
10-10'	OCH ₃	56,8	12H	3,82	m ^a
- αCH_2 -	CH ₂	64,1-64,3	4H	4,12-4,14	t ^a = 6,5 Hz
		62,4 ^b		4,42 ^b	t ^b = 7,0 Hz
-CH ₂ -	CH ₂	25,6-29,4	xH ^c	1,34-1,67	m

^a s = singulet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet.

^b Donnés pour le mono-ester à n = 2.

^c x = 2(n-2) avec n = le nombre total d'atomes de carbone de la chaîne alkyle.

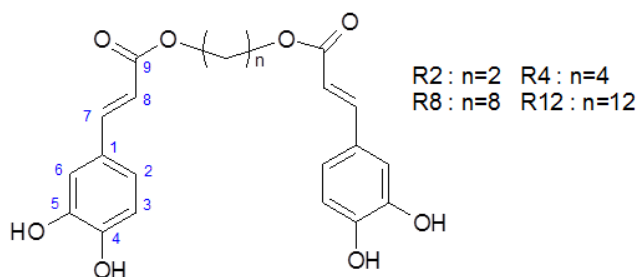


Figure 23 : Structure des di-esters d'acide caféique avec différentes chaînes aliphatiques (n = 2, 4 8, 12).

Tableau 17 : Données de RMN ^{13}C et ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) des diesters d'acide caféique avec différents α,ω -diols aliphatiques (n = 2, 4, 8 et 12).

C	$(\delta/\text{ppm})^{13}\text{C}$		$(\delta/\text{ppm})^1\text{H}$		
	Type	R2-R12	Type	R2-R12	Multiplicité
1	C	126	-	-	-
2	CH	121,9	2H	7,00	dd ^a = 2,0 Hz; 8,3 Hz
3	CH	116,2	2H	6,76	d ^a = 8,3 Hz
4	C	148,9	-	-	-
5	C	146,0	-	-	-
6	CH	115,3	2H	7,06	d = 2,0 Hz
7	CH	114,4	2H	6,28	d = 15,9 Hz
8	CH	145,6	2H	7,49	d = 15,9 Hz
9	C=O	167,0	-	-	-
-CH ₂ $_{\alpha}$ -	CH ₂	63,9-64,3	4H	4,11-4,17	t ^a = 6,6 Hz
		62,1 ^b		4,50 ^b	t = 7,0 Hz ^b
-CH ₂ -	CH ₂	25,6-29,2	xH ^c	1,27-1,74	m ^a

^a dd = doublet de doublet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet.

^b Donnés pour le mono-ester à n = 2.

^c x = 2(n-2) avec n = le nombre total d'atomes de carbone de la chaîne alkyle.

2.8. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE EN MILIEUX HOMOGENE ET HETEROGENE.

2.8.1. Evaluation de l'activité antioxydante des produits d'estérification par le test CAT (Conjugated Autoxidizable Triene assay)

Le test des Triènes Conjugués Autooxydables, ou test CAT (*Conjugated Autoxidizable Triene assay*) est une méthode basée sur la mesure de l'oxydation d'une émulsion H/E d'huile de Tung purifiée et stabilisée avec un émulsifiant non ionique (Laguerre *et al.*, 2008). L'huile de Tung

contient naturellement de la triéléostéarine, un triacylglycérol à base d'acide α -éléostéarique. Cet acide gras ($\approx 73\%$ de la totalité des acides gras) possède un triène conjugué facilement oxydable, qui se caractérise par un fort signal trifide dans le domaine UV avec une longueur d'onde d'absorption maximale de 273 nm. L'oxydation de l'huile de Tung (accélérée par l'action de l'AAPH, un initiateur radicalaire azo hydrosoluble), au travers de la destruction des triènes conjugués de l'acide α -éléostéarique, se traduit par une extinction du signal à 273 nm. Le suivi spectrophotométrique à 273 nm des cinétiques d'oxydation, en présence et absence d'une molécule donnée, permet une détermination directe de la capacité antioxydante de cette molécule.

Préparation et caractérisation physiques des nanoémulsions

La préparation de l'émulsion est réalisée selon la méthode décrite par Laguerre *et al.* (2008) avec quelques modifications. 40 mg d'huile de Tung purifiée sont ajoutés à 200 mL de tampon phosphate (PBS, pH 7,2), contenant 70 μ M de Brij 35 (émulsifiant neutre, MM estimée = 1198 g/mol). Le mélange est ensuite homogénéisé dans un homogénéisateur Ultra Turrax (Janke & Kunkel, Staufen, Germany) à 15 000 rpm pendant 90 secondes. La macroémulsion résultante est passée deux fois à travers un microfluidiseur (LM20 Microfluidizer Processor, Microfluidics, USA) configuré avec une chambre de type 75 μ m Y-type à 20 000 psi, pour finalement donner une nanoémulsion. Cette dernière est caractérisée, en termes de distribution de tailles de gouttelettes, par diffusion statique de la lumière (Nicomp Nano Z3000, USA). Toutes les nanoémulsions préparées possèdent des gouttelettes de tailles similaires ($D_{50} = 200 \pm 20$ nm) et sont physiquement stables pendant au moins la durée des expériences (6h).

Procédure expérimentale du test CAT.

Quatre solutions mères de Trolox (antioxydant de référence) et de chaque molécule à tester sont préparées à des concentrations différentes avec du DMSO. Ces solutions doivent être réalisées de façon à obtenir, une fois dans l'émulsion, une concentration finale comprise entre 0 et 10 μ M. Ici, le DMSO est utilisé pour sa capacité à solubiliser l'ensemble des molécules test, y compris les plus hydrophobes (notamment les mono- et diesters à longues chaînes aliphatiques). Des solutions témoins (DMSO sans antioxydant) sont également préparées.

Ensuite, 10 µL de chaque solution mère contenant la molécule test (ou le témoin) à des concentrations différentes sont ajoutés à 10 mL de nanoémulsion et le mélange est vortexé pendant 5 secondes (le reste des solutions mères est conservé sous atmosphère inerte à 20°C pour être utilisé dans les 48 heures qui suivent). 50 µL des nanoémulsions contenant les molécules test à différentes concentrations sont transférés dans une microplaque à 96 puits (Greiner, Frickenhausen, Allemagne) adaptée aux mesures spectrales dans l'UV (absorbance de la microplaque à 273 nm = 0,03). Enfin, 150 µL d'une solution extemporanée d'AAPH (1,3 mM, PBS) sont ajoutés dans les puits. Au total, chaque puits contient 200 µL d'émulsion avec des concentrations finales de 0,05 mg/mL d'huile de tung, 17,5 µM de Brij 35, 1 mM d'AAPH et 0 à 10 µM de molécule test. La cinétique de la réaction est suivie immédiatement après l'ajout de l'AAPH en mesurant la décroissance d'absorbance à 273 nm avec un lecteur microplaque modèle M1000 PRO (Tecan, Gröedig, Autriche) équipé du logiciel Magellan. Les mesures sont réalisées chaque minute pendant 6 heures à 37 ± 0,1°C, avec 5 secondes d'agitation de la plaque avant chaque mesure.

Expression des résultats du test CAT

Pour normaliser les résultats, les absorbances brutes sont transformées en absorbances relatives suivant l'équation (6) :

$$\text{Absorbance relative} = \frac{A_t}{A_0} \quad (6)$$

Où A_t et A_0 sont les absorbances mesurées aux temps t et 0 minutes, respectivement. L'aire sous la courbe (ASC) correspondant à la décroissance relative de l'absorbance à 273 nm est calculée suivant l'équation (7) :

$$\text{ASC} = 1 + \frac{A_1}{A_0} + \frac{A_2}{A_0} + \dots + \frac{A_{359}}{A_0} + \frac{A_{360}}{A_0} \quad (7)$$

La protection nette d'un antioxydant est ensuite calculée en réalisant la différence entre l'ASC en présence d'un antioxydant (ASC Echantillon) et l'ASC du témoin (ASC témoin) correspondant à une solution sans antioxydant. Le Trolox est utilisé comme antioxydant de référence et l'activité antioxydante (valeur CAT) d'une molécule est donnée en équivalent Trolox selon l'équation (8) :

$$\text{Valeur CAT (eq. Trolox)} = \frac{(\text{ASC échantillon} - \text{ASC témoin})}{(\text{ASC Trolox} - \text{ASC témoin})} \times \frac{(\text{moles de Trolox})}{(\text{moles d'échantillon})}$$

(8)

2.8.2. Mesure de l'activité antiradicalaire par la méthode DPPH•

La mesure de l'activité antiradicalaire a été réalisée selon la méthode décrite par Brand-Williams *et al.* (1995), et adaptée à une utilisation en microplaque.

Une solution mère du radical stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) à 167 µM est préparée avec de l'éthanol (ou du méthanol). Le mélange est agité pendant 1 h sous agitation magnétique et protégé de la lumière. Ensuite, six solutions filles (concentrations finales dans les puits allant de 25 à 250 µM) sont réalisées pour obtenir une courbe de calibration du DPPH• (Figure 24). Chaque puit d'une microplaque à 96 puits est rempli avec 180 µL de chaque solution et 20 µL d'éthanol ou méthanol. La plaque est thermostatée à 37°C et l'absorbance est immédiatement mesurée à 515 nm (donnée sous forme de moyenne de trois lectures instantanées avec 5 secondes d'agitation avant lecture) avec un lecteur microplaque modèle M1000 PRO (Tecan, Gröedig, Autriche) équipé du logiciel Magellan. D'après la courbe de calibration, la concentration adéquate en DPPH• à utiliser pour les tests d'activité antiradicalaire est de 100 µM.

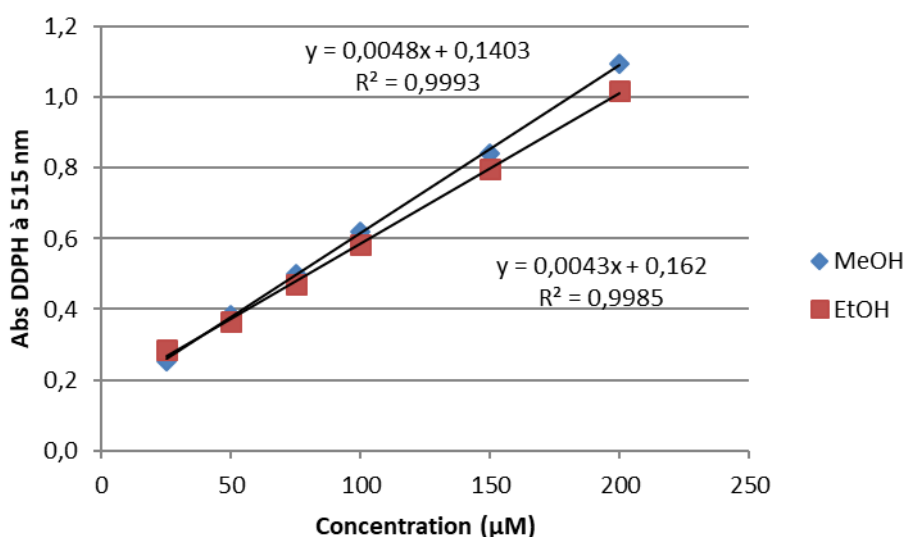


Figure 24 : Courbes de calibration du radical DPPH• solubilisé dans MeOH ou EtOH.

Pour estimer le temps nécessaire à chaque échantillon pour exercer sa pleine activité antiradicalaire et à atteindre un état stationnaire, des cinétiques sont réalisées avec les différentes molécules test et le Trolox pris comme antioxydant de référence. Ainsi, six solutions (concentrations finales dans les puits allant de 100 à 350 μM) de chaque molécule test sont préparées dans l'éthanol pour les esters d'acide sinapique ou dans du méthanol pour les esters d'acide caféique. Le reste de la solution stock est gardée sous atmosphère inerte à -20°C pour être utilisé dans les 5 jours qui suivent. Ensuite, 20 μL des solutions contenant les échantillons sont introduites dans les puits d'une plaque à 96 puits avec 180 μL d'une solution fraîche de DPPH à 167 mM dans l'éthanol (ou méthanol). Enfin, chaque puit contient un volume final de 200 μL avec des concentrations finales de 150 mM en DPPH et les molécules tests (divers composés phénoliques) à différentes concentrations (50 à 175 μM). L'absorbance est immédiatement mesurée à 515 nm, toutes les 10 minutes pendant 2 heures à 30°C , avec un lecteur microplaque modèle M1000 PRO (Tecan, Gröedig, Autriche) équipé du logiciel Magellan. Entre chaque lecture, la microplaque est retirée du lecteur, recouverte d'un film adhésif (pour éviter l'évaporation du solvant) et protégée de la lumière. Par ailleurs, un témoin contenant uniquement 20 μL d'éthanol ou méthanol (sans antioxydant) et 180 μL de solution de DPPH* à 167 mM est réalisé afin d'obtenir une correction de la chute du signal intrinsèque du DPPH* au cours du temps. Cette correction permet d'éviter une surestimation de l'activité antiradicalaire du composé testé. Dans ces circonstances, il est possible de calculer l'absorbance corrigée au cours du temps (qui correspond à l'action propre de la molécule test) de la façon suivante (9) :

$$\text{Abs}^c = \text{Abs}_t + \text{Abs}^{b_{t_0}} - \text{Abs}^{b_t} \quad (9)$$

Où Abs_c est l'absorbance corrigée de l'échantillon, Abs_t l'absorbance de l'échantillon à chaque minute de réaction, et $\text{Abs}^{b_{t_0}}$ et Abs^{b_t} les absorbances respectives du blanc (180 μL de DPPH* 167 μM et 20 μL d'éthanol ou méthanol) à 0 min et à chaque intervalle de temps. Le pourcentage de DPPH* restant est calculé avec l'équation suivante (10) :

$$\% \text{ DPPH}^* = (\text{Abs}_t^c / \text{Abs}_{t_0}^c) \times 100 \quad (10)$$

Où $\text{Abs}_{t_0}^c$ est l'absorbance corrigée de l'échantillon à 0 min, et Abs_t^c l'absorbance corrigée à chaque intervalle de temps. Ainsi pour chaque concentration en composé test, il est possible de

déterminer le % de DPPH[•] restant à l'état stationnaire (%DPPH^{•(ES)}), en traçant la courbe % de DPPH[•] en fonction du temps (Figure 25).

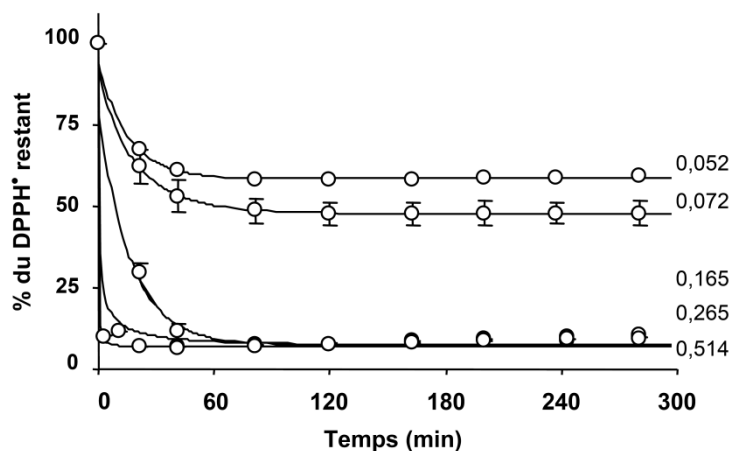


Figure 25 : Exemple classique de l'évolution du % de radical DPPH[•] au cours du temps dans des solutions contenant une molécule antiradicalaire à différentes concentrations.

Le pourcentage de DPPH[•] restant à l'état stationnaire (%DPPH^{•(ES)}) peut alors être représenté en fonction du ratio molaire AOx/DPPH[•] (Figure 26), où AOx représente la molécule test.

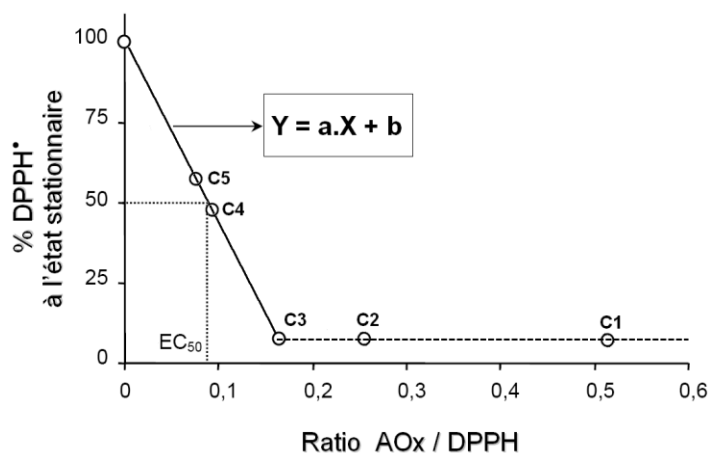


Figure 26 : Exemple de la détermination de l'activité antiradicalaire d'un antioxydant exprimée en EC₅₀ ou n^{ES}.

Le pourcentage de DPPH[•] suit, jusqu'à atteindre un minimum, une tendance linéaire dont l'expression est donnée par l'équation (11) :

$$\% \text{ DPPH}^{\bullet(\text{ES})} = a \cdot (\text{AOx})/(\text{DPPH}^{\bullet}) + b \quad (11)$$

La capacité antiradicalaire peut être définie alors comme (i) EC_{50} , la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer de 50 % la concentration initiale en DPPH[•], (ii) ou n^{ES} , la quantité de DPPH[•] réduite par quantité d'AOx à l'état stationnaire.

Les valeurs de EC_{50} , et n^{ES} sont déterminées, à partir des équations (12) et (13) comme suit :

$$- EC_{50} = (50-a)/b \quad (12)$$

$$- n^{ES} = 1/(2.EC_{50}). \quad (13)$$

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

PARTIE 1. CARACTERISATIONS CHIMIQUES DES MATIERES PREMIERES A BASE DE COLZA ET DE TOURNESOL

Les tourteaux de colza et de tournesol sont des coproduits très hétérogènes contenant des protéines, de la lignine, des celluloses et hémicelluloses, ainsi que d'autres composés mineurs dont les composés phénoliques. Dans cette partie de l'étude, nous nous sommes concentrés sur la caractérisation chimique de nos différentes matières premières avec, dans un premier temps, la détermination des teneurs en composés phénoliques simples (individuels et totaux) des tourteaux de colza et de tournesol industriels et non-industriel, puis la détermination des teneurs en protéines, lignine, humidité, lipides et cendres uniquement des tourteaux non-industriels. Il est important de noter que tous les tourteaux étudiés dans ce travail (colza, tournesol, industriel et non-industriel) sont issus de la trituration de graines non décortiquées.

1.1. CARACTERISATION FINE DES COMPOSES PHENOLIQUES SIMPLES DE COLZA ET DE TOURNESOL

Concernant l'identification des composés phénoliques simples de colza et de tournesol (acides phénoliques et dérivés), des tourteaux non-industriels ont été choisis du fait que, théoriquement, ils contiennent plus de composés phénoliques que les tourteaux industriels (**traités thermiquement, voir section 2.2.3. de la partie Matériels & Méthodes**). En effet, les tourteaux industriels subissent au cours des procédés de trituration un traitement thermique à haute température qui se traduit par une diminution significative de la teneur en CPT (composés phénoliques totaux) (Zago et *al.*, 2015b). Les tourteaux bruts de colza et de tournesol non-industriels (non décortiqués, non traités thermiquement) ont d'abord été broyés à l'aide d'un broyeur à bille (5 min, 70 Hz) afin d'obtenir une poudre homogène de faible granulométrie propice à l'extraction (Remarque : compte tenu de leur faible teneur initiale en huile - **voir section 1.2** - une délipidation préalable des tourteaux à l'hexane n'a pas été nécessaire). Les composés phénoliques ont ensuite été entièrement extraits en utilisant du méthanol pur à 75°C pendant 20 min. Ce solvant a été choisi parmi différents mélanges méthanol/H₂O du fait (i) qu'il présente une

efficacité d'extraction similaire à celle des autres mélanges (concentration en CPT extraits peu différente d'un mélange à l'autre) et (ii) que l'absence d'eau permet de limiter l'extraction d'autres molécules polaires indésirables, tels que saccharides et polysaccharides hydrosolubles, minéraux, protéines de faible poids moléculaire etc (Cai and Arntfield, 2001). Finalement, les composés phénoliques extraits ont été structurellement identifiés par HPLC-MS et quantifiés par HPLC-UV. Concernant le tourteau de tournesol, l'identification et la quantification des composés phénoliques extraits ont été réalisées uniquement par HPLC-UV.

Composition des extraits de tourteaux de colza

La composition qualitative de l'extrait méthanolique est présentée en Figure 27 et dans le Tableau 18, avec au total dix-neuf composés phénoliques identifiés. Comme attendu, le composé majoritaire est la sinapine (composé 1) avec une teneur de $12,4 \pm 0,2$ mg/g MSD, soit 75% en masse des CPT. La teneur en acide trans-sinapique (composé 9) est en revanche beaucoup plus faible avec $0,9 \pm 0,0$ mg/g MSD. Les autres composés phénoliques, dont les structures ont pu être élucidées par HPLC-MS (Tableau 18) ont été identifiés comme étant des mono-, di- ou tri-esters de l'acide sinapique contenant des sucres (glucose ou gentiobiose) et/ou des unités kaempférol. Les résultats obtenus dans cette étude sont en accord avec les données de la littérature (Baumert *et al.*, 2005; Siger *et al.*, 2013; Zago *et al.*, 2015).

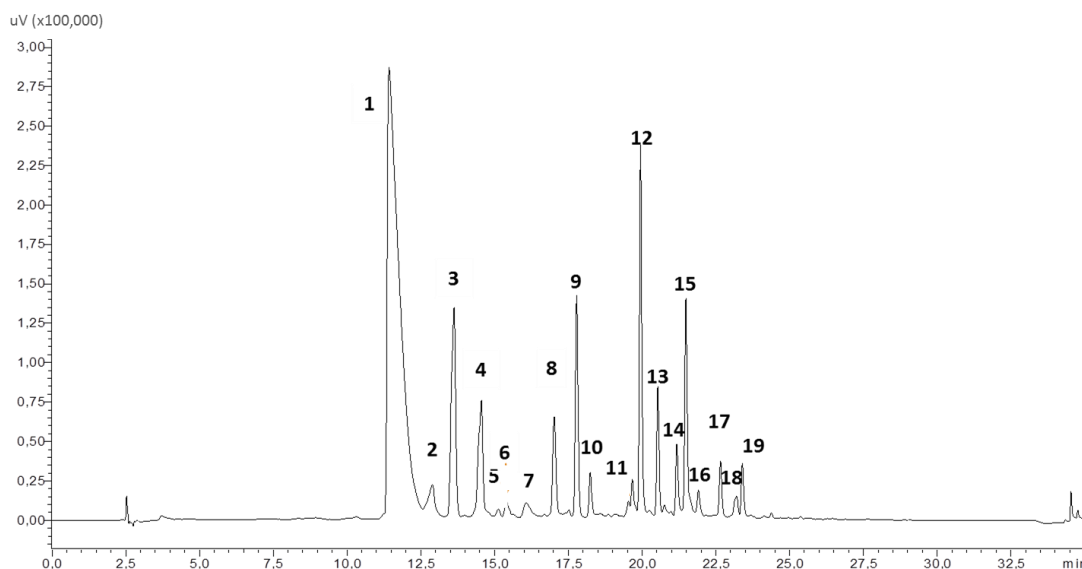


Figure 27 : Profil HPLC à 328 nm d'un extrait méthanolique de tourteau de colza non-industriel.

Composé	λ max	$[M-H]^-$ m/z	$[M+H]^+$ m/z	Nom
1	328	294	310	Sinapine
2	328	771	n.d.	Kaempférol-3-O-sophoroside-7-O- β -glucopyranoside
3	332	385	207	Sinapoyl-glucopyranoside
4	333	977	979	Sinapoyl-Kaempférol ; dérivé 1
5	327	520	n.d.	n.d.
6	323	547	665	n.d.
7	307	494	496	Spermidine cyclique
8	328	237	207	Sinapoyl-Kaempférol ; dérivé 2
9	323	223	207	Acide trans-sinapic
10	323	223	207	Acide cis-sinapic
11	332	977	979	Kaempférol-di-hexoside-sinapoyl-hexoside
12	330	753	777	Di-sinapoyl gentiobioside ; isomère 1
13	328	753	777	Di-sinapoyl gentiobioside ; isomère 2
14	327	977	979	Sinapoyl-Kaempférol ; dérivé 3
15	330	591	369	Di-sinapoyl glucopyranoside
16	327	n.d.	n.d.	n.d.
17	326	959	737	Tri-sinapoyl gentiobioside ; isomère 1
18	328	959	737	Tri-sinapoyl gentiobioside ; isomère 2
19	328	959	737	Tri-sinapoyl gentiobioside ; isomère 3

Tableau 18 : Principaux composés phénoliques de l'extrait méthanolique de tourteau non-industriel de colza identifiés par HPLC-MS. Note : n.d. : non-déterminé.

Habituellement, la détermination des composés phénoliques totaux (CPT) d'extraits naturels est réalisée par la méthode spectrophotométrique de Folin-Ciocalteu du fait que la plupart des molécules des extraits ne sont pas commerciales en tant que standards. Si la méthode de Folin-Ciocalteu à l'avantage d'être simple et rapide, elle présente cependant l'inconvénient majeur d'être peu sélective du fait que le réactif de Folin peut également réagir avec d'autres espèces réductrices telles que des sucres ou des peptides (Peterson, 1979; Vuorela *et al.*, 2004), ce qui peut conduire à une surestimation des valeurs et, *in fine*, des teneurs en CPT. De ce fait, nous avons choisi de déterminer les teneurs en CPT à partir des données chromatographiques obtenues par HPLC à 328 nm (longueur d'onde maximale de la sinapine, composé majoritaire de l'extrait de colza) qui sont spécifiques des composés phénoliques, et plus particulièrement des acides hydroxycinnamiques. Concrètement, la teneur exprimée en mg d'équivalents d'acide sinapique (EAS)/g MSD, a été calculée à partir de l'aire totale des pics correspondant à tous les composés phénoliques contenant des unités sinapoyl, l'aire de chaque pic étant divisée par le nombre d'unité(s) sinapoyl contenue(s) dans la molécule considérée. Nous avons pu ainsi déterminer dans le tourteau de colza non-industriel, une teneur moyenne en CPT de $16,6 \pm 0,8$

mg EAS/g MSD, ce qui est en accord avec les valeurs citées dans d'autres études ayant utilisées la même méthodologie de quantification (Cai and Arntfield, 2001; Khattab *et al.*, 2010).

Composition des extraits de tourteaux de tournesol

Concernant l'extrait méthanolique de tourteau de tournesol, le profil chromatographique obtenu par HPLC, à 326 nm (Figure 28) est un peu moins complexe puisque onze composés phénoliques différents ont été détectés, puis identifiés à partir des temps de rétention comparés à ceux de standards (commerciaux pour le 5-CQA et l'acide caféique ou extraits de feuilles d'*Ilex paraguariensis* pour les trois isomères d'acide di-caféoylquinique) ou fournis par la littérature (Weisz *et al.*, 2009).

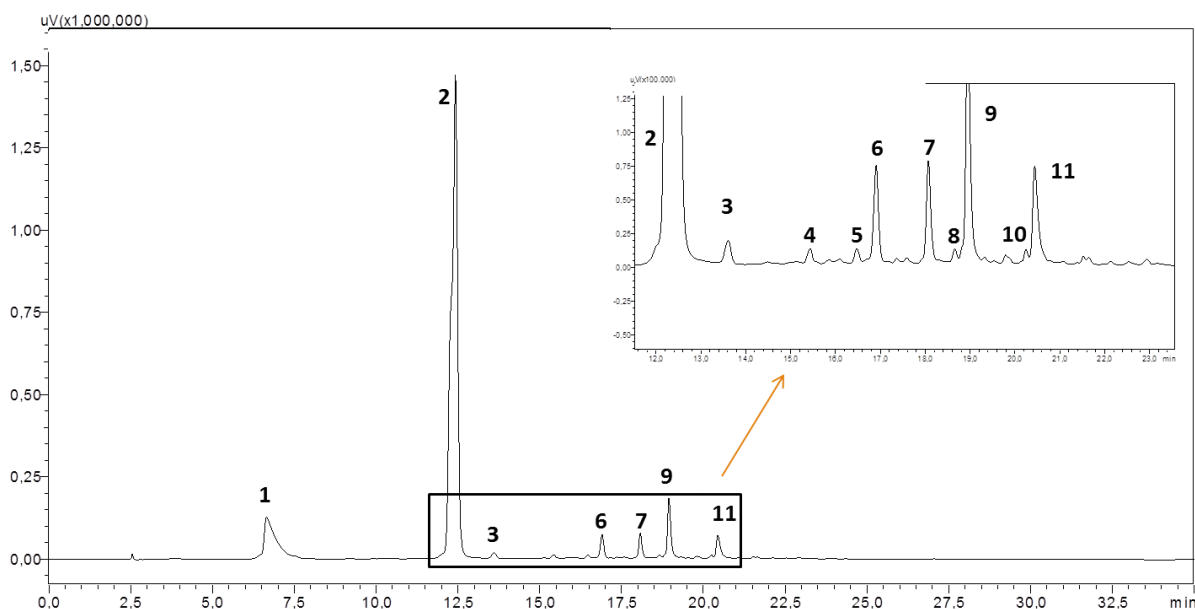


Figure 28 : Profil HPLC à 326 nm d'un extrait méthanolique de tourteau de tournesol non-industriel.

Les deux principaux composés sont les acides 4- et 5-caféoylquinique (4-CQA et 5-CQA), représentés par le même pic [2] en raison de leur co-élution dans les conditions d'analyse mises en œuvre. De ce fait, ces deux isomères ont été quantifiés ensemble et désignés tout au long de ce travail par le terme unique d'«acide chlorogénique». Avec une concentration de $18,8 \pm 0,5$ mg/g MSD, ce dernier représente 73% de la teneur en CPT du tourteau de tournesol étudié. À côté de l'acide chlorogénique, les autres composés identifiés dans l'extrait sont, par ordre

décroissant d'abondance, l'acide 3-caféoylquinique [1], les acides 3,5- et 4,5-di-caféoylquinique [9, 11], l'acide 5-*O*-feruloylquinique [7], l'acide 5-*O*-coumaroylquinique [6], ainsi que des traces d'acides phénoliques libre comme l'acide caféique [3] (Tableau 19). Comme pour le colza, la teneur en CPT a été déterminée à partir des données de chromatographie obtenues par HPLC à 326 nm (longueur d'onde d'absorption maximale des acides caféoylquiniques, composés majoritaires) et exprimée en mg d'équivalents d'acide chlorogénique (EAC)/ g MSD. En moyenne, la teneur en CPT est de $25,6 \pm 0,7$ mg EAC/g MSD, ce qui est en accord avec d'autres études ayant utilisé la même méthodologie de quantification (Pedrosa *et al.*, 2000; Weisz *et al.*, 2009).

Composé	λ max	Nom
1	327	Acide 3- <i>O</i> -caféoylquinique
2	326	Acide 4- <i>O</i> - and 5- <i>O</i> -caféoylquinique
3	323	Acide caféique
4	327	n.d.
5	327	n.d.
6	327	Acide 5- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroylquinique
7	329	Acide 5- <i>O</i> -feruloylquinique
8	326	Acide 3,4-di- <i>O</i> -caféoylquinique
9	328	Acide 3,5-di- <i>O</i> -caféoylquinique
10	327	n.d.
11	328	Acide 4,5-di- <i>O</i> -caféoylquinique

Tableau 19 : Composition de l'extrait méthanolique du tourteau non-industriel de tournesol. Note : n.d. : non-déterminé.

Effet des traitements thermiques sur les teneurs en composés phénoliques des tourteaux

A titre comparatif, la concentration en composés phénoliques individuels et totaux des tourteaux industriels a également été déterminée. Pour les échantillons de colza, la sinapine a été choisie comme indicateur de la variation de la teneur en composés phénoliques individuels entre les deux tourteaux du fait qu'il s'agit du composé phénolique majoritaire. Pour les échantillons de tournesol, c'est l'acide chlorogénique qui a été choisi comme référence. Les résultats obtenus peuvent être observés sur la Figure 29.

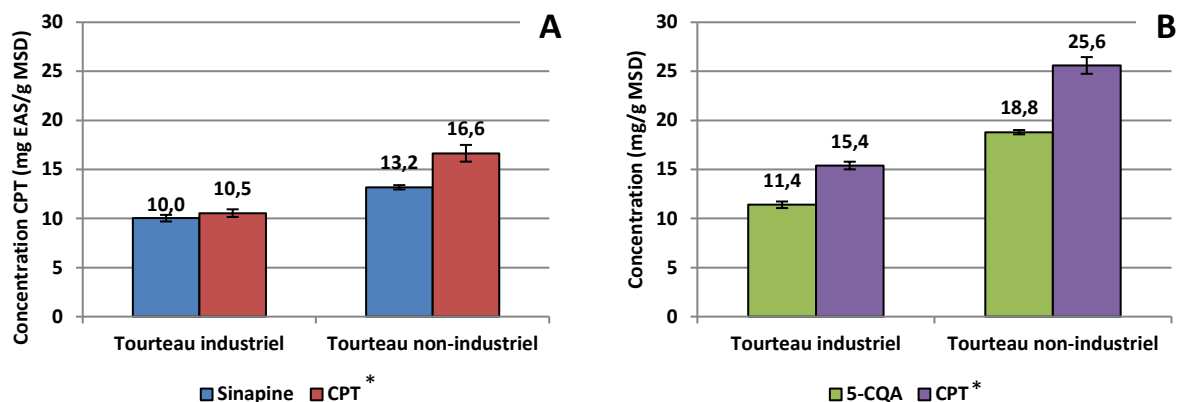


Figure 29 : Concentration en sinapine, acide chlorogénique et CPT des tourteaux industriels et non-industriels de colza (A) et de tournesol (B). *CPT : en mg d'EAS/g MSD pour les échantillons de colza et en mg d'EAC/g MSD pour les échantillons de tournesol.

Pour les échantillons de colza, les teneurs en sinapine et CPT sont inférieures respectivement de 24% et 37% dans le tourteau industriel, ce qui indique que les traitements thermiques (**voir section 2.2.3. de la partie Matériels & Méthodes**) ont eu un impact moindre sur la sinapine que sur les autres dérivés d'acide sinapique. Avec une baisse de l'ordre de 40% du 5-CQA et des CPT dans le tourteau industriel, l'impact des traitements thermiques s'avère encore plus important pour le tournesol, vraisemblablement en raison de la plus grande fragilité du noyau catéchol de l'acide caféique.

Ces résultats confirment bien l'impact négatif des traitements thermiques sur les concentrations en composés phénoliques des tourteaux, dont la diminution dépend du type de molécule concerné et des traitements subis (identiques ici pour le colza et le tournesol).

L'objectif majeur de cette thèse étant la valorisation des composés phénoliques de colza et de tournesol, nous nous sommes donc focalisés sur les tourteaux non-industriels, c'est-à-dire les matières premières ayant les teneurs les plus élevées en composés phénoliques et ayant subi le moins de dégradation. Une caractérisation plus large de ces tourteaux, en termes de teneurs en protéines, lignine, humidité, cendres et lipides, a donc été réalisée. Les résultats sont présentés dans la section suivante.

1.2. DETERMINATION DES CONCENTRATIONS EN PROTEINES, LIGNINE, HUMIDITE, CENDRES ET LIPIDES DES TOURTEAUX NON-INDUSTRIELS DE COLZA ET DE TOURNESOL.

Le Tableau 20 permet de récapituler les différents résultats obtenus pour la caractérisation complète des tourteaux de colza et de tournesol non-industriels. On notera premièrement les faibles teneurs en huile des deux tourteaux (environ 2% en MS) qui rendent compte de l'efficacité de l'étape d'extraction à l'hexane après trituration des graines. Deuxièmement, le tourteau de colza présente des concentrations supérieures en protéines et en cendres par rapport au tourteau de tournesol. En revanche, les concentrations en lignine et en composés phénoliques sont plus élevées dans le tourteau de tournesol. Finalement, ces résultats sont très similaires aux données de la littérature (fiche qualité tournesol/colza, Terres Univia, 2016).

Tourteau	Humidité (%)	Protéines (% MSD)	Lipides (% MS)	Cendres (% MSD)	Lignine* (% MSD)	CPT (% MSD)	Autres (% MSD)
Colza	11,0 ± 0,0	37,7 ± 1,4	1,7 ± 0,1	7,9 ± 1,0	10,9 ± 0,8	1,7 ± 0,08	40,0 ± 1,8
Tournesol	7,5 ± 0,0	31,8 ± 1,6	2,0 ± 0,1	5,8 ± 0,5	15,2 ± 0,5	2,6 ± 0,07	42,6 ± 1,7

Tableau 20 : Composition moyenne des tourteaux non-industriels de colza et de tournesol.

*Lignine de Klason. Les valeurs sont des moyennes ± ET (n=3).

Pour terminer, les teneurs en protéines et en composés phénoliques des coques, pellicules et amandes de colza et de tournesol délipidées issues d'échantillons non traités thermiquement ont également été déterminés. Les résultats peuvent être visualisés dans le Tableau qui suit :

	Colza		Tournesol	
	Amande	Pellicule	Amande	Coque
CPT (en mg/g MSD*)	20,3 ± 0,6	1,02 ± 0,1	41,5 ± 0,7	1,48 ± 0,1
Protéines (% MSD)	48,3 ± 1,4	15,35 ± 1,3	52,6 ± 1,8	16,75 ± 1,8

Tableau 21 : Teneurs en protéines et CPT des coques, pellicules et amandes de colza et de tournesol délipidées, issues d'échantillons non traités thermiquement. *La teneur en CPT est exprimée en mg d'EAS/g MSD pour les échantillons de colza et en mg d'EAC/g MSD pour les échantillons de tournesol. Les valeurs sont des moyennes ± ET (n=3).

Après avoir caractérisé nos différentes matières premières, une étude sur le fractionnement par voie sèche des tourteaux de colza et de tournesol non-industriels a été réalisée afin d'isoler la fraction phénolique.

PARTIE 2. SEPARATION DE LA FRACTION PHENOLIQUE DES TOURTEAUX DE COLZA ET DE TOURNESOL

2.1. FRACTIONNEMENT PAR VOIE SECHE DES TOURTEAUX NON-INDUSTRIELS DE COLZA ET DE TOURNESOL POUR LA SEPARATION DE LEUR FRACTION PHENOLIQUE.

A l'heure actuelle, l'extraction des protéines de tourteaux oléagineux est basée sur des traitements alcalins qui permettent de solubiliser les protéines et de les concentrer sous forme d'isolat. De même, des extractions liquide-solide sont nécessaires pour isoler les composés phénoliques des tourteaux. Cependant, ces procédés ne laissent généralement pas intacts les autres composants des matières premières utilisées (en particulier les protéines), ils sont coûteux en énergie, réactifs et solvants, et requièrent le traitement d'effluents (Barakat and Rouau, 2014). Par ailleurs, ces procédés s'avèrent parfois inefficaces pour séparer individuellement la totalité des constituants des matières premières. C'est la raison pour laquelle le fractionnement par voie sèche, basé sur des procédés physiques et mécaniques qui ne nécessitent ni solvant, ni réactif et ne génèrent aucun effluent, a été envisagé comme alternative, sinon comme étape d'enrichissement préalable, aux procédés assistés par solvants cités plus haut.

Le fractionnement par voie sèche procède généralement en deux étapes successives. La première est constituée d'un broyage au cours duquel la matière première, soumise à des contraintes mécaniques de nature (impact, cisaillement, compression etc..) et d'intensité variables, est divisée à différentes échelles de taille pouvant aller jusqu'aux constituants mêmes des matrices cellulaires. Elle est suivie d'une étape de séparation des particules en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Pour être efficace, un procédé de fractionnement global doit donc satisfaire à trois conditions : (i) une matière première suffisamment hétérogène en termes de composition biochimique et physico-chimique, (ii) un procédé de broyage capable de générer des particules présentant des différences de caractéristiques (taille, densité, composition, friabilité, polarisabilité...) marquées et enfin, (iii) une technologie de séparation basée sur la ségrégation des particules en fonction d'une ou plusieurs de ces caractéristiques.

Au regard de ce qui précède et de leur hétérogénéité, les tourteaux de graines non décortiquées de colza et de tournesol semblent bien adaptés au fractionnement par voie sèche. En outre, comme vu dans la **partie 3.2.1 du chapitre « Etat de l'art »**, les travaux réalisés par Barakat *et al.* (2015) et Basset *et al.* (2016) ont montré l'efficacité des procédés de fractionnement par voie sèche à séparer les protéines des tourteaux de colza et de tournesol. En revanche, dans ces travaux, le devenir des composés phénoliques simples (hors lignine) n'a pas été étudié. Nous avons donc envisagé d'appliquer ce type de procédé à nos matières premières afin de déterminer s'il était en mesure de séparer les composés phénoliques, les protéines et autres constituants de façon efficace et sélective.

Dans ce travail, une étude sur le broyage ultrafin (UF) des tourteaux non-industriels de colza et de tournesol a été réalisée afin de déterminer l'influence de la distribution de la taille des particules sur les étapes de séparation ultérieures. Dans un premier temps, les tourteaux ont été finement broyés sous contraintes mécaniques combinant impact et cisaillement. A cette étape, trois grilles à trous de différents diamètres ont été employées afin de générer des farines de granulométries et de distributions de tailles des particules différentes. Dans un deuxième temps, les tourteaux finement broyés ont été fractionnés au cours d'une étape unique de tri électrostatique (TE) ou de turbo séparation (TS). L'efficacité de chaque technique de séparation a été déterminée au travers d'indicateurs comme la composition chimique (teneur en protéines, lignines, CPT), la distribution de taille des particules et le rendement massique des différentes fractions générées au cours de la séparation. Enfin, l'amélioration du rendement de récupération de la fraction d'intérêt a été spécifiquement étudiée dans le cas du tri électrostatique.

2.1.1. Effet du broyage ultrafin (UF) sur les caractéristiques physico-chimiques des tourteaux.

Avant de réaliser le broyage ultra-fin, les tourteaux initiaux de colza et de tournesol ont été préalablement broyés grossièrement en utilisant un broyeur à couteaux équipé d'une grille à trous de 2 mm. Ensuite, le broyage à impact et cisaillement a été appliqué aux farines obtenues en utilisant un appareil de type UPZ100 Fine Impact à température ambiante. Afin d'obtenir différentes distributions de taille de particules, trois grilles à taille de trous décroissante ont été utilisées : 0,5 mm, 0,3 mm et 0,1 mm pour le colza et 0,5 mm, 0,3 mm et 0,2 mm pour le tourteau

de tournesol (la grille à trous de 0,1 mm n'a pu être utilisée en raison de problèmes de colmatage de l'appareil). A des fins de simplification, les différents tourteaux finement broyés ont été nommés comme suit :

- pour les tourteaux de colza : TxC-« taille de la grille »,
- pour les tourteaux de tournesol : TxT-« taille de la grille ».

Les différentes caractéristiques physico-chimiques des tourteaux de colza et de tournesol finement broyés, ainsi que leur rendement de récupération, sont présentés dans le Tableau 22.

	Tourteaux de Colza				Tourteaux de tournesol			
	Initial	TxC-0,5	TxC-0,3	TxC-0,1	Initial	TxT-0,5	TxT-0,3	TxT-0,2
Taille de pores de grille (mm)	--	0,5	0,3	0,1	--	0,5	0,3	0,2
Rendement de récupération (m%)	--	96,0 ± 0,6 ^a	95,8 ± 0,8 ^a	95,9 ± 0,3 ^a	--	97,0 ± 0,2 ^a	96,3 ± 0,8 ^a	88,8 ± 0,9 ^a
Protéines (g/100g MSD)	37,7 ± 0,8 ^b	37,9 ± 0,2 ^b	39,0 ± 0,1 ^c	39,5 ± 0,3 ^c	31,8 ± 1,2 ^b	31,3 ± 0,0 ^b	30,3 ± 0,1 ^c	35,0 ± 0,0 ^d
Sinapine (mg/g MSD)	13,2 ± 0,2 ^d	11,8 ± 0,3 ^e	11,8 ± 0,4 ^e	12,4 ± 0,2 ^e	--	--	--	--
Acide chlorogénique (mg/g MSD)	--	--	--	--	18,8 ± 0,5 ^e	17,3 ± 0,3 ^f	18,3 ± 0,2 ^e	17,3 ± 1,0 ^e
CPT*	16,6 ± 0,8 ^f	15,6 ± 0,6 ^f	15,6 ± 0,3 ^f	16,6 ± 0,3 ^f	25,6 ± 0,7 ^f	25,3 ± 0,4 ^f	24,6 ± 0,2 ^f	23,7 ± 1,6 ^f
D ₅₀ (µm)	--	110,9 ± 9,1 ^g	69,3 ± 0,6 ^h	23,7 ± 1,0 ⁱ	--	105,5 ± 8,3 ^g	65,2 ± 1,1 ^h	18,8 ± 0,6 ⁱ

Tableau 22 : Taille des particules, rendement de récupération et composition des tourteaux broyés UF de colza et de tournesol. Note : *La teneur en CPT est exprimée en mg d'EAS/g MSD pour les échantillons de colza et en mg d'EAC/g MSD pour les échantillons de tournesol. Pour chaque matière première (colza ou tournesol), les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, $p \geq 0,05$. Les valeurs sont des moyennes ± ET (n=3).

Les résultats obtenus montrent que la diminution de la taille des trous de la grille entraîne une diminution proportionnelle de la D₅₀ de chaque tourteau (Figure 30). Cette diminution de taille n'a cependant pas d'impact significatif sur les rendements de récupération (de l'ordre de 96 % m/m), à l'exception du tourteau de tournesol TxT-0,2 (88,8 ± 0,1% m/m). De même, les teneurs en composés phénoliques individuels (sinapine ou acide chlorogénique) et CPT ne sont pas affectées par le broyage et la diminution de la taille des particules. En revanche, la diminution de la taille des particules s'accompagne d'une augmentation significative de la teneur en protéines,

particulièrement remarquable dans le cas du tourteau TxT-0,2. Ceci peut s'expliquer par la perte d'une fraction des particules de pellicules de colza et de coques de tournesol dont les comportements au broyage diffèrent sensiblement. D'après les travaux réalisés par Asad *et al.* (2017), les pellicules de colza sont légèrement plus résistantes et plus difficiles à broyer que les coques de tournesol et conduisent à des particules de plus grandes tailles. A l'inverse, les coques de tournesol riches en fibres sont plus finement broyées, ce qui entraîne des phénomènes d'agglomération des particules et de colmatage des parois internes du broyeur. Cela se traduit finalement par une baisse du rendement de récupération en fin d'étape de broyage, baisse d'autant plus importante que les particules sont fines. Il est à noter que ce type de problème avait déjà été relevé par Pelgrom *et al.* (2014) dans leur l'étude sur le broyage de graines de lupin et la séparation de fractions riches en protéines.

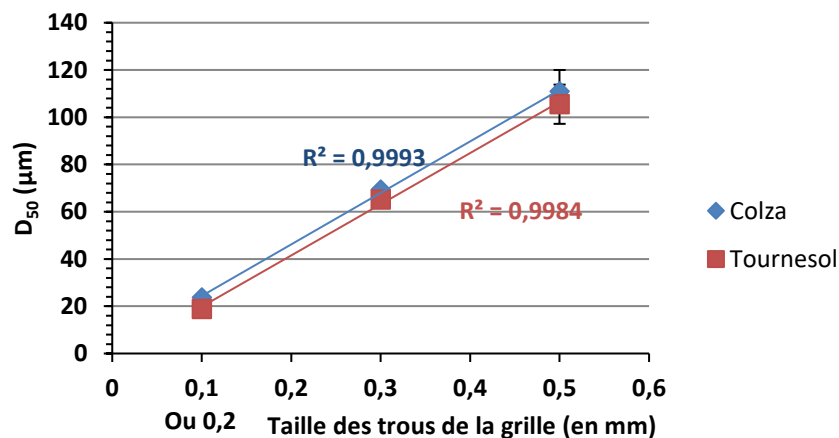


Figure 30 : Influence de la taille des trous de la grille de broyage sur la D₅₀ des tourteaux de colza et de tournesol. Les valeurs sont des moyennes \pm ET (n=3).

L'effet du broyage sur la distribution des tailles de particules (en fraction volumique %) des tourteaux peut être observé sur les Figures 31-A (colza) et 31-B (tournesol). Dans le cas des échantillons de colza, la diminution de la taille des trous de la grille conduit progressivement à l'apparition de deux populations de particules, dont les modes se situent autour de 63 μ m et 11 μ m pour l'échantillon le plus finement broyé TxC-0,1. Or, comme nous l'avons vu dans la **partie 2.2 du chapitre 1 « Etat de l'Art »**, les corps protéiques de colza et de tournesol sont de petite taille d'environ 4 μ m de diamètre. De ce fait et compte tenu des différences de structure et de

propriétés mécaniques des amandes et des pellicules, nous avons émis l'hypothèse que la population correspondant aux particules les plus fines (mode d'environ 11 μm) pouvait être constituée majoritairement de fragments d'amandes et de corps protéiques (détachés des matrices cellulaires des amandes), alors que la population contenant les particules de plus grandes tailles (mode d'environ 63 μm) était davantage constituée de fragments de pellicules, riches en lignine.

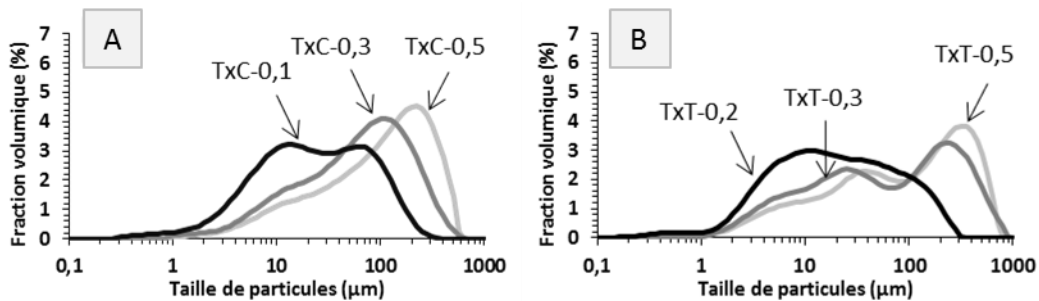


Figure 31 : Distribution des tailles de particules des échantillons de colza (A) et de tournesol (B) obtenus après broyage UF avec différentes tailles de grilles. Note : FF (fraction fine), FPe (fraction positive de l'électrode), FG (fraction grossière), FNe (fraction négative de l'électrode).

En revanche, le phénomène inverse est observé pour les échantillons de tournesol, avec l'apparition de trois populations différentes (modes entre 5 et 350 μm) lorsque le tourteau est broyé avec les grilles aux pores les plus larges, c'est-à-dire 0,5 mm et 0,3 mm. Comme précédemment, nous avons fait l'hypothèse que les deux populations de particules de faible taille (modes entre 5-10 μm et 25-35 μm) pouvaient renfermer majoritairement des fragments d'amande et des corps protéiques, à l'inverse de la population de particules de grande taille constituée davantage de fragments de coques. En outre, l'unique population obtenue après broyage avec la grille à pores de 0,2 mm (Figure 31-B) pourrait signifier qu'un broyage trop intense conduit à une fragmentation des coques telle, que les particules générées ont des tailles similaires à celle des fragments d'amande ou des corps protéiques.

Comme nous venons de le voir, les conditions de broyage ainsi que la nature des matières premières mises en œuvre ont une influence directe sur la distribution des particules générées en lien avec leur composition. Or, cela n'est pas sans conséquence sur les étapes ultérieures de séparation. Par exemple, l'étude réalisée par Hemery *et al.* (2009) sur le fractionnement du son

de blé, a clairement montré qu'un broyage trop intense produisait de fines particules fibreuses qui, lors de l'étape de séparation, conduisaient à des phénomènes d'agglomération avec les particules riches en protéines. Ce problème de diminution de la qualité des protéines par contamination avec des particules fibreuses a été relaté dans divers travaux postérieurs à cette étude (Schutyser *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016).

2.1.2. Séparation électrostatique des tourteaux de colza et de tournesol finement broyés

2.1.2.1. Influence de la distribution des tailles de particules sur l'efficacité de la séparation et la composition des fractions produites

Le principe du tri électrostatique est basé sur la présence de charges partielles à la surface des particules. Les particules initialement non chargées ou électriquement neutres, sont chargées par tribo-électricité puis séparées dans un champ électrique entre deux électrodes, l'une chargée positivement et l'autre négativement. La Figure 32 permet de visualiser de façon schématique le procédé de tri électrostatique.

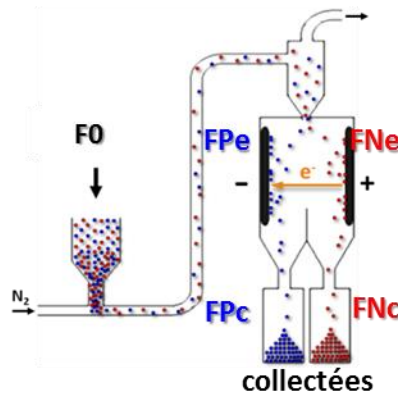


Figure 32 : Schéma simplifié du procédé de tri électrostatique.

Dans cette étude, les échantillons de colza et de tournesol finement broyés ont été séparés au cours d'une seule étape de tri électrostatique. Pour chaque échantillon, quatre fractions différentes sont récupérées en fin de séparation :

- Fraction positive de l'électrode **FPe** : particules chargées positivement, présentes sur l'électrode négative,

- Fraction négative de l'électrode **FNe** : particules chargées négativement, présentes sur l'électrode positive,
- Fraction positive de collecte **FPe** : particules chargées positivement dans le bac de collecte,
- Fraction négative de collecte **FNe** : particules chargées négativement dans le bac de collecte.

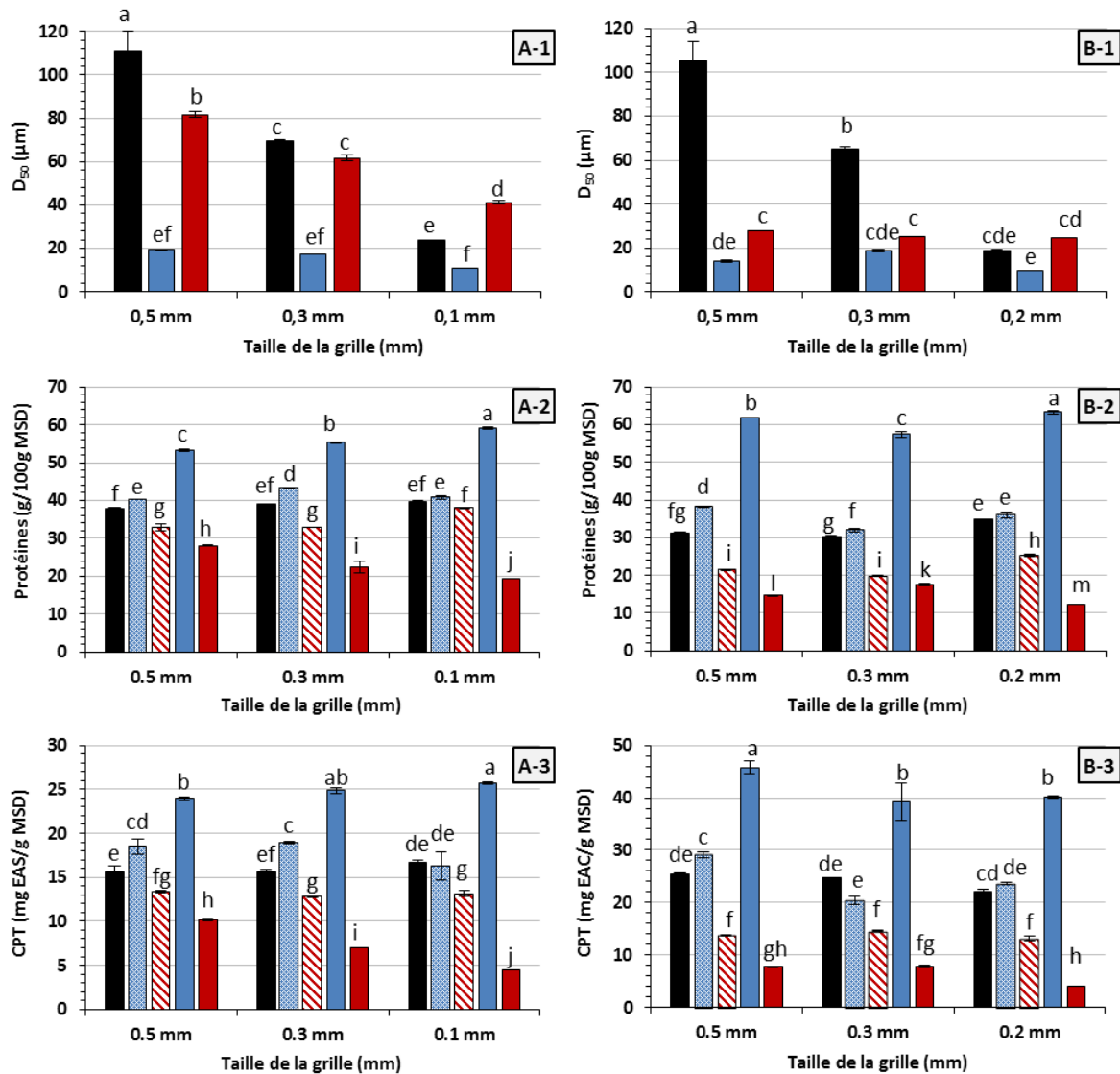


Figure 33 : Caractérisation des fractions de colza (A) et de tournesol (B) obtenues après une seule étape de séparation électrostatique, en fonctions des différentes tailles de grilles : D₅₀ (1), protéines (2) et CPT (3). Fractions : (■) F0, (▨) FPC, (▩) FNC, (■) FPe et (■) FNe. Pour chaque matière première (colza ou tournesol), les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, $p \geq 0,05$. Les valeurs sont des moyennes \pm ET (n=3).

Dans la Figure 33 ci-dessus, nous avons reporté la taille moyenne des particules D_{50} (en volume), la teneur en composés phénolique (individuels et totaux) ainsi que la teneur en protéines des quatre fractions (FPe, FNe, FPc, FNc) issues du tri électrostatique des tourteaux de tournesol et colza broyés à l'étape précédente (fractions initiales dénommées F0).

Globalement, quel que soit le type de tourteau, il peut être constaté que la D_{50} des fractions FPe (histogrammes en bleu) est significativement inférieure à celle des fractions FNe (histogrammes en rouge) (Figure 33-A1 et 33-B1). Il est à noter cependant que la réduction de la granulométrie des tourteaux de départ (en relation avec la taille des trous de la grille de broyage) induit une diminution de la D_{50} des fractions FPe et FNe dans le cas des échantillons de colza, alors que pour le tournesol, la D_{50} des fractions FNe varie peu et que celle des fractions FPe passe par un maximum correspondant à la grille à trous de 0,3 mm (Figure 33-B1).

Ces différences sont possiblement dues aux fines particules fibreuses de coques de tournesol qui peuvent s'agglomérer avec les corps protéiques et entraîner une augmentation de la D_{50} . Néanmoins, la fraction FPe issue du tourteau TxT-0,2 n'est vraisemblablement pas concernée par ce problème d'agglomération puisque la plupart des particules fibreuses fines ont été perdues lors de la production de cet échantillon.

Remarque : afin de ne pas surcharger la Figure 33 (A1-B1) nous n'avons pas reporté les valeurs de D_{50} des fractions collectées FPc ou FNc. Elles sont néanmoins nettement plus élevées que celles des fractions récupérées sur les électrodes (FPe et FNe) ce qui indique clairement que la séparation des particules les plus fines est beaucoup plus efficace sur les électrodes.

Visuellement, les fractions positives (FPe ou FPc) des échantillons de colza et de tournesol sont de couleur claire tandis que les fractions négatives (FNe ou FNc) sont beaucoup plus sombres (Figure 34). Cet aspect constitue une bonne indication du degré de séparation des particules d'amande (de couleur crème) riches en protéines, des particules de coque et pellicule de couleur gris-noir, ce qui a pu être vérifié indirectement par une teneur en protéines beaucoup plus élevée des fractions FPe par rapport à celle des fractions FNe (Figure 33-A2 et 33-B2).

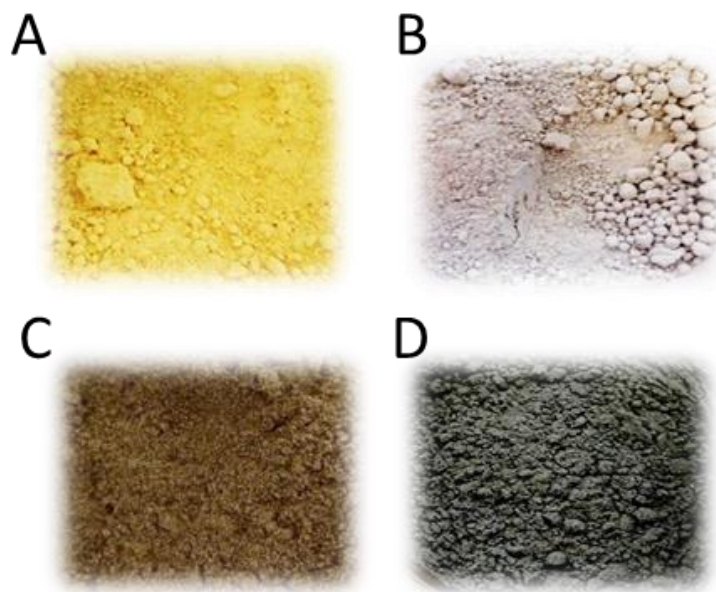


Figure 34 : Quelques exemples de fractions obtenues après séparation électrostatique des tourteaux de colza et de tournesol : (A) TxC-FPe-0,1, (B) TxT-FPe-0,5, (C) TxC-FNe-0,1 et (D) TxT-FNe-0,5.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Hemery *et al.* (2011), Wang *et al.* (2016), Barakat *et al.* (2015) et Basset *et al.* (2016) qui ont montré que les particules riches en protéines avaient plutôt tendance à être chargées positivement par tribo-électricité et qu'elles s'aggloméraient sur l'électrode chargée négativement.

Les résultats illustrés par les Figures 33-A3 et 33-B3 montrent également que les protéines et les composés phénoliques simples (acides hydroxycinnamiques et dérivés) se retrouvent concentrés dans les mêmes fractions, quel que soit le tourteau. Ceci confirme bien que les composés phénoliques sont essentiellement présents dans l'amande des graines (Baumert *et al.*, 2005; Fang *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012; Weisz *et al.*, 2009) et qu'ils y sont répartis d'une manière telle (peut-être sous forme de complexes non covalent avec les protéines) qu'il ne peuvent être séparés des protéines par des procédés de broyage et de séparation électrostatique.

Enfin, concernant les fractions de collecte, il peut être constaté que leurs concentrations en protéines et en CPT sont légèrement différentes de celles des fractions initiales F0. Il est donc raisonnable de penser qu'une fois que les électrodes sont recouvertes de particules, leur effet

attractif diminue de telle sorte que les particules suivantes se répartissent de façon quasi statistique entre les deux bacs de collecte.

D'un point de vue quantitatif, l'effet de la granulométrie du tourteau de départ sur la D_{50} et la composition des fractions issues du tri électrostatique (TE), s'est traduit différemment suivant le type de tourteau comme indiqué dans le Tableau 22.

Remarque : par souci de simplification, les fractions obtenues par TE ont été nommées de la façon suivante : « type de tourteau de départ : TxC ou TxT » – « fraction après TE : FPe, FNe, FPc ou FNC » – « taille de grille de broyage », et rappelées sous ces termes dans la suite du manuscrit. Ainsi, TxC-FPe-0,1 correspond à la fraction FPe issue du tri électrostatique de l'échantillon TxC-0,1, lui-même obtenu par broyage du tourteau de colza avec la grille à trous de 0,1mm.

Concernant les échantillons de colza, la fraction TxC-FPe-0,1, issue du tourteau le plus finement broyé (TxC-0,1, $D_{50} = 23,7 \pm 0,1 \mu\text{m}$) s'avère la plus concentrée en protéines ($59,1 \pm 0,4 \text{ g}/100\text{g MSD}$) et en CPT ($25,8 \pm 0,1 \text{ mg d'EAS/g MSD}$) - soit une hausse de 50% et 55% respectivement par rapport au tourteau TxC-0,1 de départ - tout en étant exempte de lignine (Tableau 23). A l'inverse, la fraction TxC-FNe-0,1 correspondante se caractérise par les plus faibles teneurs en protéines ($19,3 \pm 0,1 \text{ g}/100\text{g MSD}$) et CPT ($4,2 \pm 0,0 \text{ EAS}/100\text{g MSD}$), et la plus élevée en lignine ($31,4 \pm 0,5 \text{ g}/100\text{g MSD}$).

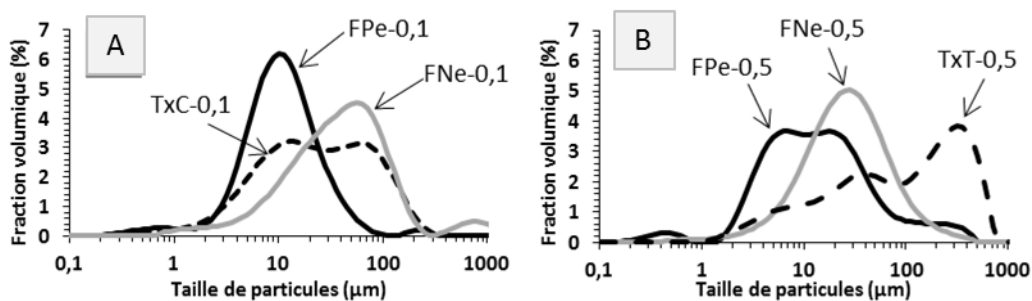


Figure 35 : Distribution des tailles de particules des échantillons de colza (A) et de tournesol (B) avant (pointillés) et après séparation électrostatique (traits pleins).

Par ailleurs, il est intéressant d'observer sur la Figure 35-A, la superposition des profils granulométriques des fractions TxC-FPe-0,1 et TxC-FNe-0,1 avec celui de l'échantillon TxC-0,1. Ces différents éléments, semblent indiquer que le tri électrostatique a été en mesure de séparer les

deux populations de particules de l'échantillon TxC-0,1, corroborant ainsi l'hypothèse que nous avons émise en **section 2.1**. En outre, les teneurs en protéines et CPT particulièrement élevées de la fraction FPe et très supérieures à celles de l'amande de graine de colza délipidée (protéines = $48,3 \pm 1,4$ g/100g MSD, CPT = $20,3 \pm 0,6$ mg EAS/100g MSD, **Tableau 21 section 1.2**), confirme que le tri électrostatique va au-delà d'une simple séparation des fragments d'amande et de coque et qu'il permet un enrichissement concomitant en corps protéiques et en composés phénoliques. Cela suppose cependant un broyage préalable suffisamment fin pour déstructurer les matrices cellulaires et libérer les corps protéiques.

Pour ce qui est des échantillons de tournesol, l'augmentation la plus importante en protéines et en CPT est associée à la fraction TxT-FPe-0,2. Cependant, cette amélioration étant liée aux pertes des particules fibreuses de coques pendant l'étape de broyage, cet échantillon n'a pas été pris en considération puisqu'il ne permet pas véritablement de mettre en évidence l'efficacité du procédé de séparation.

Notre attention s'est donc portée sur les fractions issues du tourteau le plus grossièrement broyé TxT-0,5 ($D_{50} = 105 \pm 8,3$ μ m). Pour rappel, les concentrations en protéines, CPT et lignine du tourteau TxT-0.5 sont respectivement de $31,3 \pm 0,0$ g/100g MSD ; $25,3 \pm 0,4$ mg d'EAC/g MSD et $15,2 \pm 0,2$ g/100g MSD (Tableau 23).

Comme précédemment pour le colza, mais de manière encore plus spectaculaire, la fraction TxT-FPe-0,5 se caractérise par une augmentation des concentrations en protéines ($61,1 \pm 0,0$ g/100g MSD) et CPT ($45,8 \pm 1,1$ mg d'EAC/g MSD), respectivement de +96% et +80%, et l'absence totale de lignine. A l'inverse, la fraction TxT-FNe-0,5 correspondante voit ces teneurs en protéines ($14,7 \pm 0,0$ g/100g MSD) et CPT ($7,9 \pm 0,2$) réduites de 53% et 69% respectivement, et sa teneur en lignine augmentée de 75%.

Si l'on compare à présent les teneurs en protéines et CPT de la fraction TxT-FPe-0,5 à celles de l'amande de graine de tournesol ($52,6 \pm 1,8$ g/100g MSD et $41,5 \pm 0,7$ mg EAC/100g MSD respectivement - **Tableau 21, section 1.2**), il apparaît clairement que la fraction TxT-FPe-0,5 s'est enrichie en protéines (+17%) et, dans une moindre mesure, en composés phénolique (+11%). A nouveau, il peut être avancé que le tri électrostatique permet non seulement de séparer les

fragments d'amandes de ceux des coques, mais également de concentrer les différents corps protéiques détachés des matrices cellulaires, comme semble le confirmer les profils granulométriques des fractions TxT-FPe-0,5 (deux populations de particules), TxT-FNe-0,5 (une population de particules) et de l'échantillon TxT-0,5 (Figure 35-B). Finalement, un broyage préalable avec une grille à trous de $\varnothing=0,5\text{mm}$ s'avère donc bien adapté puisqu'il permet une libération des corps cellulaires des matrices sans pour autant générer de particules de coques trop fines et susceptibles de provoquer des problèmes d'agglomération et de contamination de la fraction protéique.

Caractéristiques Physico-chimiques	Colza			Tournesol		
	TxC-0,1	TxC-FPe-0,1	TxC-FNe-0,1	TxT-0,5	TxT-FPe-0,5	TxT-FNe-0,5
D ₅₀ (μm)	23,7±1,0 ^a	11,0±0,0 ^b	41,3±0,6 ^c	105,5±8,3 ^a	14,1±0,6 ^b	27,6±0,0 ^c
Rendement de récupération (g/100g)	--	9,2±1,0 ^d	4,8±2,1 ^e	--	18,0 ^{**}	2,7 ^{**}
Protéines (g/100g MSD)	39,5±0,3 ^f	59,1±0,4 ^g	19,3±0,1 ^h	31,3±0,0 ^d	61,7±0,0 ^e	14,7±0,1 ^f
Sinapine (mg/g MSD)	12,4±0,2 ⁱ	18,8±0,1 ^j	3,0±0,1 ^k	--	--	--
Acide chlorogénique (mg/g MSD)	--	--	--	17,3±0,3 ^g	32,7±0,8 ^h	5,5±0,1 ⁱ
CPT*	16,6±0,3 ^l	25,8±0,1 ^m	4,2±0,0 ⁿ	25,3±0,4 ^j	45,8±1,1 ^k	7,7±0,2 ^l
Lignine (g/100 g MSD)	10,9±0,4 ^o	0,0±0,0 ^p	31,4±0,5 ^q	15,2±0,2 ^m	0,0±0,0 ⁿ	26,2±0,8 ^o

Tableau 23 : Caractérisation physico-chimique des tourteaux TxC-0,1 (Colza) et TxT-0,5 (tournesol), ainsi que leurs fractions FPe et FNe respectives, obtenues après séparation électrostatique. Note : *la teneur en CPT est exprimée en mg d'EAS/g MSD pour les échantillons de colza et en mg d'EAC/g MSD pour les échantillons de tournesol. Pour chaque matière première (colza ou tournesol), les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, $p \geq 0,05$, Les valeurs sont des moyennes \pm ET ($n=3$), à l'exception des valeurs suivies par ** (essai unique).

2.1.2.2. Amélioration des rendements en fraction d'intérêt (FPe) par recyclage des fractions de collecte

Bien que les fractions TxC-FPe-0,1 et TxT-FPe-0,5 soient les plus concentrées en protéines et en composés phénoliques, et donc les plus intéressantes du point de vue des objectifs de cette thèse, leur rendement de récupération après une seule étape de tri électrostatique reste néanmoins très faible de l'ordre de 9 % et 18 % respectivement. Afin d'améliorer ce rendement, plusieurs étapes de recyclage des fractions de collectes (FPc et FNc) ont été réalisées selon la méthodologie

décrite en **section 2.3.3 du chapitre « Matériels et Méthodes »**. Cette méthodologie s'inspire des travaux Wang *et al.* (2016) qui ont eux-mêmes cherché à améliorer le rendement en fraction protéique après séparation électrostatique de farines de graines de lupin.

Les résultats obtenus peuvent être visualisés sur la Figure 36. Dans le cas du colza (Figure 36-A1), quatre étapes de recyclage ont été nécessaires pour augmenter de 9% à 31% le rendement cumulé en fraction TxT-FPe-0,1. Pour le tournesol, le rendement cumulé final en fraction TxT-FPe-0,5 est de 32 % après trois étapes de recyclage (Figure 36-B1). Si cette amélioration du rendement cumulé s'accompagne d'une diminution significative de la teneur en protéines (environ 6 % et 14% pour les fractions de colza et tournesol respectivement), elle n'affecte pas en revanche la teneur en CPT qui reste constante au cours des étapes de recyclage (Figure 36-A2 et 36-B2).

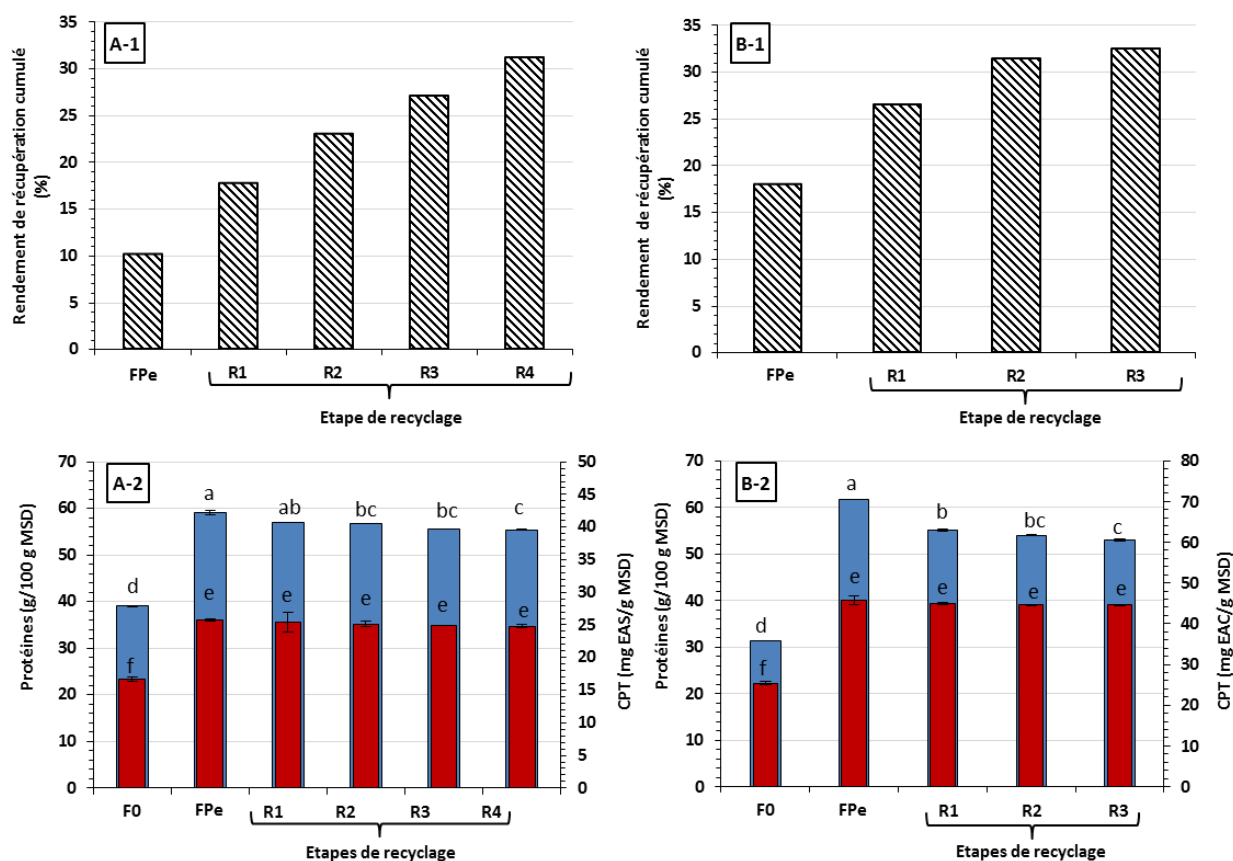


Figure 36 : Rendement cumulé de récupération (▨) des fractions TxT-FPe-0,1 (A-1) et TxT-FPe-0,5. Evolution des teneurs en protéines (■) et CPT (■) des fractions TxT-FPe-0,1 (A-2) et TxT-FPe-0,5 (B-2) en fonction du nombre d'étapes de recyclage. Les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, $p \geq 0,05$, Les valeurs sont des moyennes \pm ET ($n=3$).

La diminution de la teneur en protéines lors des étapes de recyclage avait déjà été observée par Wang *et al.* (2016). Selon ces auteurs, cette baisse de concentration en protéines provient du fait que la composition physico-chimique des différentes particules de tourteau n'est pas homogène : les particules de plus faible taille et qui contiennent le plus de corps protéiques sont plus facilement chargées par triboélectricité et sont récupérées pendant la première étape de séparation. Un épuisement progressif des particules riches en protéines se produit alors durant les étapes de recyclage suivantes, entraînant une diminution du rendement de récupération et de la teneur en protéines des particules séparées.

Il est important de noter à ce stade que la méthodologie que nous avons mise en œuvre diffère radicalement de celle que Barakat *et al.* (2015) et Basset *et al.* (2016) ont utilisée pour la séparation électrostatique de tourteaux de colza et de tournesol, avec le même type d'appareil et dans les mêmes conditions opératoires.

En effet, ces auteurs se sont intéressés uniquement aux fractions de collecte (et non aux fractions recueillies sur les électrodes) au cours d'un procédé en « cascade » qui peut se résumer comme suit : la fraction initiale « F0 » subit une séparation électrostatique qui conduit à la récupération de deux fractions de collecte, l'une chargée positivement « F1A- » et l'autre chargée négativement « F1B+ ». Ces deux fractions subissent à leur tour une séparation électrostatique permettant de récupérer quatre fractions de collecte : les fractions F2A- et F2A+ issues de la fraction F1A-, et les fractions F2B+ et F2B- issues de la fraction F1B+. Enfin, les fractions F2A- et F2B+ sont soumises à une dernière étape de séparation qui génère les fractions F3A- et F3A+ d'un côté et les fractions F3B- et F3B+ de l'autre. Ainsi, grâce à cette méthodologie en cascade, la teneur initiale en protéines de 37% d'un tourteau de colza (F0, $D_{50} = 89,7 \mu\text{m}$) est passée à 51 % dans la fraction F3B+ ($D_{50} = 89,3 \mu\text{m}$), avec un rendement de récupération associé de 43% (Basset *et al.*, 2016).

Comparée à la précédente, notre méthodologie de séparation électrostatique centrée sur la fraction positive de l'électrode et assistée par des étapes de recyclages des fractions de collecte, permet de produire des fractions plus concentrées en protéines et en composés phénoliques, avec néanmoins des rendements plus modestes de l'ordre de 30%.

2.1.3. Turbo séparation des tourteaux finement broyés de colza et tournesol

2.1.3.1. Influence du broyage UF préalable et de la vitesse de rotation du cylindre de tri

Comme nous l'avons mentionné dans la partie bibliographique, la turbo-séparation est une technologie relativement ancienne de séparation de particules en fonction de leur taille et de leur densité. Elle a été appliquée avec succès au fractionnement de nombreuses matières premières, notamment pour la production de concentrats protéiques à partir de graines de lupin, de pois chiche, de haricot, de lentille, ou encore de niébé (Sosulski and Youngs, 1979). Habituellement, les particules de petites tailles contenant les corps protéiques sont récupérées dans les fractions fines tandis que les grosses particules riches en lignine, albumine et/ou en fibres sont récupérés dans les fractions grossières.

Dans notre étude, les tourteaux de colza et de tournesol finement broyés ont été séparés par turbo-séparation en utilisant trois vitesses de rotation du cylindre de tri : 3000 tpm, 5000 tpm et 7000 tpm. Après chaque étape de séparation, deux fractions sont récupérées : une fraction fine (FF) et une fraction grossière (FG).

Remarque : les fractions obtenues ont été nommées de la façon suivante : « type de tourteau de départ : TxC ou TxT » – « fraction après TS : FF ou FG » – « taille de grille de broyage », et rappelées sous ces termes dans la suite du manuscrit. Ainsi, TxC-FF-0,1 désigne la fraction fine FF issue de la turbo-séparation de l'échantillon TxC-0,1, lui-même obtenu par broyage du tourteau de colza avec la grille à trous de 0,1mm. Par ailleurs, F0 désigne le tourteau de départ, par opposition aux fractions générées.

Visuellement tout d'abord, la couleur de toutes les FF récupérées après séparation s'est avérée plus claire que celle des FG correspondantes, et ce, quelles que soient la vitesse de rotation du cylindre et la nature du tourteau traité par TS. Par analogie avec les résultats de la section précédente consacrée au tri électrostatique, la couleur des fractions obtenues après turbo séparation nous donne une première indication sur leur composition, si l'on associe la couleur claire des FF à la présence majoritaire de particules d'amande riches en protéines, et la couleur sombre des FG à leur concentration élevée en fragments de coques ou de pellicules.

Afin de le confirmer, les concentrations en protéines et en CPT ont été déterminées pour la totalité des fractions obtenues après turbo-séparation des différents tourteaux, et reportées en fonction des vitesses de rotation du cylindre de tri sur la Figure 37.

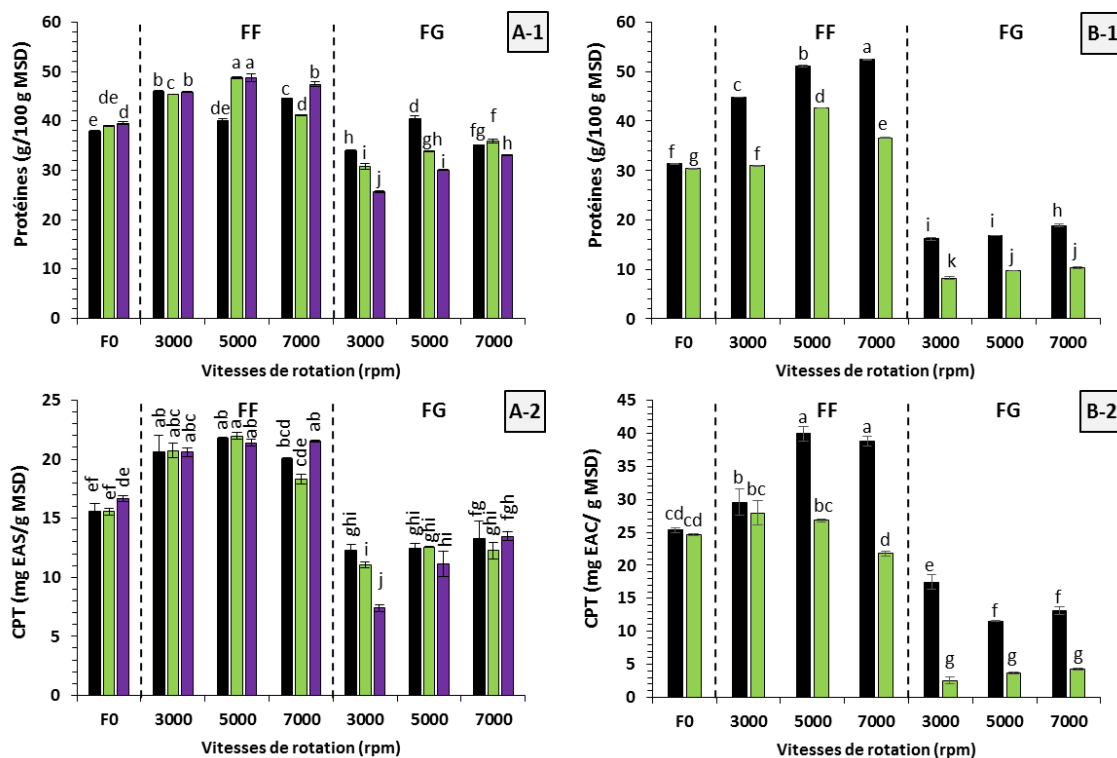


Figure 37 : Teneurs en protéines et en CPT des fractions FF et fraction FG des tourteaux finement broyés de colza (A-1 et A-2) et de tournesol (B-1 et B-2) après turbo séparation. Diamètre des trous de la grille de broyage : (■) 0,5 mm, (■) 0,3 mm, (■) 0,1mm. Pour une même matière, les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, $p \geq 0,05$, Les valeurs sont des moyennes \pm ET (n=3).

Au regard des résultats, il apparait clairement que les fractions FF contiennent plus de protéines et de composés phénoliques que les tourteaux de départ et les fractions FG, quelles que soient la nature du tourteau (colza ou tournesol), sa granulométrie (au travers de la taille de la grille de broyage) et la vitesse de tri appliquée. Ces résultats indiquent, comme pour la séparation électrostatique, que les protéines et les composés phénoliques ne peuvent être dissociés par turbo-séparation et qu'ils se retrouvent dans les mêmes fractions. Dans le cas de la fraction FF du colza, il n'existe pas de tendance claire entre vitesse de séparation et granulométrie dans l'enrichissement en protéines et composés phénoliques.

Par contre, dans le cas des FG, une augmentation des concentrations en protéines et en CPT est observée avec des vitesses de rotation croissantes sauf pour le tourteau TxC-0,1 (Figures 37-A1 et 37-A2). En outre, l'augmentation de la vitesse de rotation conduit à une diminution des rendements de récupération des fractions FF (Tableau 24). Par conséquent, il est probable que l'augmentation de la teneur en protéines des fractions FG soit liée à la présence de gros fragments d'amande parmi les particules de pellicule.

En définitive, les fractions FF qui contiennent le plus de protéines et de CPT, correspondent aux fractions issues des tourteaux TxC-0,3 et TxC-0,1 séparés à 5000 tpm (Figures 37-A1, 37-A2 et Tableau 24).

Diamètre des trous de la grille (mm)	Vitesses de séparation (tpm)	D ₅₀ (μm)	Protéines (g/100g MSD)	CPT*	Rendement FF (m %)	
Tournesol	0,5	F0	105,5±8,3	31,3±0,1	25,3±0,4	--
		3000	30,4±0,7	44,7±0,0	29,6±2,1	47,0**
		5000	20,4±0,3	51,2±0,3	39,9±1,1	30,0**
		7000	17,5±0,2	52,4±0,1	38,8±0,8	22,0**
	0,3	F0	65,2±1,1	30,3±0,1	24,6±0,2	--
		3000	53,2±1,7	31,0±0,1	27,9±1,8	70,0**
		5000	35,6±6,0	42,6±0,1	26,8±0,3	72,0**
		7000	47,8±0,0	36,6±0,0	21,8±0,4	82,0**
Colza	0,5	F0	110,9±9,1	37,9±0,2	15,6±0,6	--
		3000	22,2±0,4	46,1±0,0	20,6±1,4	34,1±3,2
		5000	23,5±0,6	40,1±0,4	21,8±0,1	20,2±3,7
		7000	11,6±0,2	44,6±0,1	20,1±0,1	4,0±1,7
	0,3	F0	69,3±0,6	39,0±0,1	15,6±0,3	--
		3000	22,6±0,8	45,4±0,1	20,7±0,4	37,9±3,8
		5000	12,0±0,5	48,7±0,2	22,0±0,2	23,5±0,7
		7000	11,8±0,6	41,2±0,1	18,3±0,4	5,4±0,2
	0,1	F0	23,7±1,0	39,5±0,3	16,6±0,2	--
		3000	16,9±0,1	45,9±0,1	20,6±0,2	58,9±0,8
		5000	10,3±0,1	48,7±0,8	21,4±0,3	40,7±0,6
		7000	8,6±0,1	47,4±0,4	21,6±0,1	25,1±1,5

Tableau 24 : Distribution des tailles de particules, rendement et composition des fractions FF des échantillons de colza et de tournesol obtenues après turbo-séparation à différentes vitesses de rotation. Note : *la teneur en CPT est exprimée en mg d'EAS/g MSD pour les échantillons de colza et en mg d'EAC/g MSD pour les échantillons de tournesol. Tpm : tour par minute. Les valeurs sont des moyennes ± ET (n=3), à l'exception des valeurs suivies par ** (essai unique).

Le rendement de récupération de la fraction TxC-FF-0,1 ($40,7 \pm 0,6\%$) est en revanche nettement supérieur à celui de la fraction TxC-FG-0,3 ($23,5 \pm 0,7\%$), ce qui réduit l'intérêt de cette dernière. Ceci est vraisemblable dû au profil granulométrique particulier du tourteau de départ TxC-0,1 ($D_{50} = 23,7 \pm 0,1 \mu\text{m}$) et à la capacité de la TS à fractionner ce tourteau en deux populations de particules, l'une fine et riche en fragments d'amande et corps protéiques (libérés durant le broyage) et l'autre plus grossière, constituée essentiellement de pellicules (Figure 38-A). En appui à ce qui précède, l'analyse des fractions TxC-FF-0,1 et TxC-FG-0,1 a révélé l'absence de lignine (apportée par les pellicules) dans la première et une concentration de $30,5 \pm 0,9 \text{ g}/100\text{g MSD}$ dans la deuxième (Tableau 25).

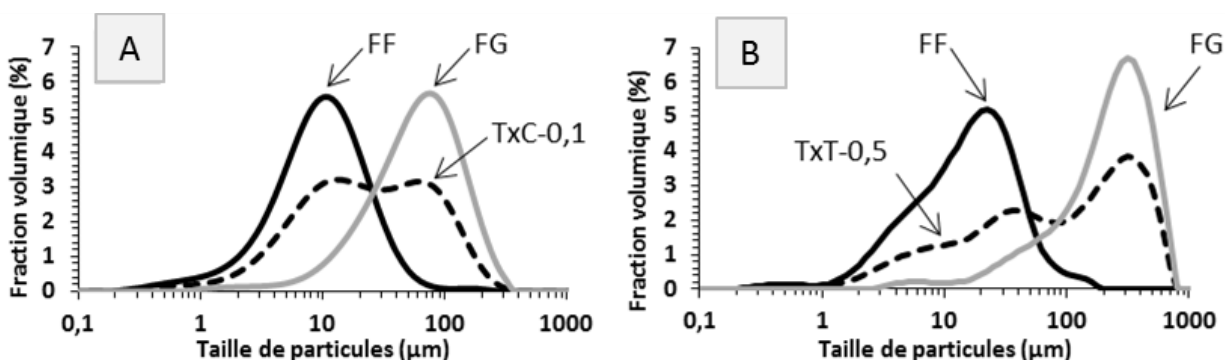


Figure 38 : Distribution des tailles de particules des échantillons de colza (A) et de tournesol (B) avant (pointillés) et après turbo-séparation (traits pleins).

Concernant le tournesol, l'effet de la vitesse de rotation du cylindre sur les teneurs en protéines et composés phénoliques des fractions fines est beaucoup plus important et contrasté selon la granulométrie du tourteau de départ (Figures 37-B1, 37-B2 et Tableau 24).

Ainsi, pour le tourteau TxT-0,5 (correspondant à F0 dans la Figure 37), l'augmentation de la vitesse de rotation de 3000 tpm à 7000 tpm s'accompagne, dans les FF correspondantes, d'un gain de 17% en protéines et de 31% en CPT, mais d'une diminution du rendement de récupération de 47% à 22%. Pour le tourteau TxT-0,3, en revanche, le gain en protéines et en CPT s'avère plus faible et uniquement pour les fractions séparées à 5000 tpm et 7000 tpm. En effet, le broyage réalisé avec la grille à trous de 0,3 mm a permis de casser les particules fibreuses des coques de tournesol et ces particules sont récupérées dans les FF, entraînant ainsi une diminution de la

teneur en protéines et en CPT. Quant au tourteau de tournesol broyé avec la grille à trous de 0,2 mm, toutes les particules sont récupérées dans la fraction FF, ce qui démontre qu'une forte diminution de la taille des particules du tourteau de tournesol rend le procédé ultérieur de turbo-séparation inefficace.

Caractéristiques physico-chimiques	Colza			Tournesol		
	F0-0,1	FF-0,1-5000	FG-0,1-5000	F0-0,5	FF-0,5-5000	FG-0,5-5000
D ₅₀ (µm)	23,7±1,0 ^a	10,3±0,1 ^b	64,9±0,2 ^c	105,5±8,3 ^a	20,4±0,3 ^b	248,9±3,3 ^c
Rendement de récupération (g/100g)	--	40,7±0,6 ^d	42,4±0,6 ^e	--	30,0 ^{**}	59,0 ^{**}
Protéines (g/100g MSD)	39,5±0,3 ^f	48,7±0,8 ^g	30,1±0,4 ^h	31,3±0,0 ^d	51,2±0,3 ^e	16,8±0,0 ^f
Sinapine (mg/g MSD)	12,4±0,2 ⁱ	16,2±0,1 ^j	8,2±0,9 ^k	--	--	--
Acide chlorogénique (mg/g MSD)	--	--	--	17,3±0,3 ^g	29,3±0,7 ^h	8,9±0,0 ⁱ
CPT*	16,6±0,3 ^l	21,4±0,3 ^m	11,1±1,0 ⁿ	25,3±0,4 ^j	39,9±1,1 ^k	11,6±0,1 ^l
Lignine (g/100 g MSD)	10,9±0,4 ^o	0,0±0,0 ^p	30,5±0,9 ^q	15,2±0,2 ^m	0,0±0,0 ⁿ	25,2±0,8 ^o

Tableau 25 : Caractérisation physico-chimique des fractions FF et FG obtenues après turbo séparation des tourteaux initiaux F0. Note : *La teneur en CPT exprimée en mg d'EAS/g MSD pour les échantillons de colza et en mg d'EAC/g MSD pour les échantillons de tournesol. Pour chaque matière première (colza ou tournesol), les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, $p \geq 0,05$. Les valeurs sont des moyennes \pm ET ($n=3$), à l'exception des valeurs suivies par ** (essai unique).

Finalement, le meilleur compromis entre concentrations en protéines et CPT, d'une part, et rendement de récupération, d'autre part, est obtenu à 5000 tpm avec le tourteau TxT-0,5. Dans la fraction fine correspondante, une amélioration de 67,4% en protéines ($51,2 \pm 0,3$ g/100g MSD), de 53,3% en CPT ($39,9 \pm 1,1$ mg d'EAC/g MSD) et un rendement de récupération de 30,0 % sont observés. Sur la Figure 38-B, les profils granulométriques du tourteau TxT-0,5 et de ses fractions (FF et FG) obtenues, illustrent l'efficacité de la turbo séparation sur cet échantillon à 5000 tpm. A noter que cette efficacité à séparer les particules de coques s'est traduite également par une concentration en lignine nulle dans la fraction fine TxT-FF-0,5 et de $25,2 \pm 0,8$ g/100g MSD dans la fraction grossière TxT-FG-0,5 (Tableau 25). En conclusion, les différents résultats présentés dans cette étude démontrent clairement que le procédé de turbo-séparation réalisé dans des conditions appropriées et à partir de tourteau de granulométrie adaptée, permet de produire des fractions fines, fortement enrichies en protéines et CPT, et des fractions grossières composées

principalement de coques ou de pellicules. Néanmoins, l'établissement de conditions optimales de séparation des fractions fines requiert des compromis entre rendement de récupération, d'une part, et teneurs en protéines et composés phénoliques, d'autre part, puisque ces paramètres évoluent en sens opposé.

2.1.4. Analyse de Microscopie Electronique à Balayage (MEB) des différentes fractions et matières premières

Dans la Figure 39 sont regroupés les clichés de microscopie électronique à balayage (MEB) de différents échantillons délipidés de colza et de tournesol tels que amandes, coques ou pellicules et fractions correspondantes après tri électrostatique et turbo-séparation.

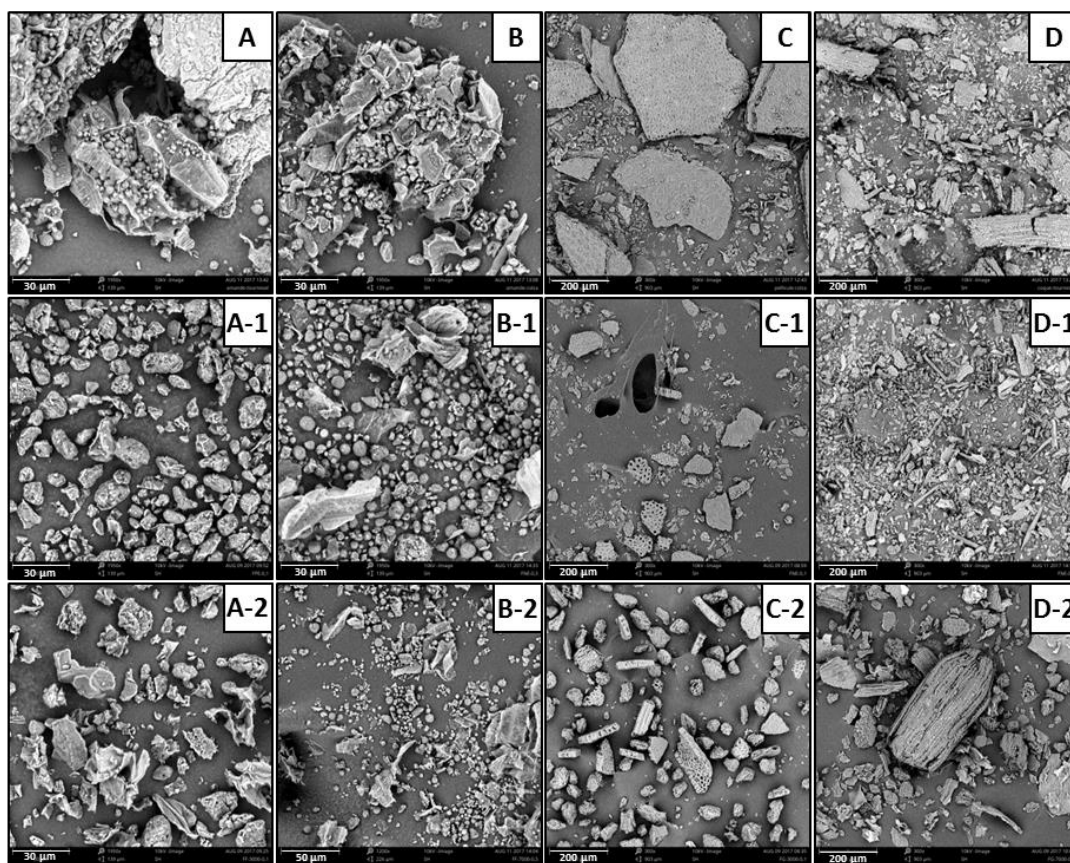


Figure 39 : Images de MEB de divers échantillons de colza et de tournesol: amandes délipidées et broyées de colza (A) et de tournesol (B), pellicules et coques délipidées et broyées de colza (C) et de tournesol (D) ; fractions obtenues après tri électrostatique : TxC-FPe-0,1 (A-1), TxT-FPe-0,5 (B-1), TxC-FNe-0,1 (C-1) et TxT-FNe-0,5 (D-1) ; fractions obtenues après turbo-séparation à 5000 tpm : TxC-FF-0,1 (A-2), TxT-FF-0,5 (B-2), TxC-FG-0,1 (C-2) et TxT-FG-0,5 (D-2).

Concernant les matières premières de départ, les images d'amandes délipidées et broyées de colza (Figure 39-A) et de tournesol (Figure 39-B) mettent en évidence la présence de corps protéiques sphériques de petites tailles (entre 3 et 6 μm) à l'intérieur des matrices cellulaires, tandis que la structure réticulée des pellicules délipidées et broyées de colza et la structure fibreuse des coques délipidées et broyées de tournesol sont particulièrement visibles sur les Figures 39-C et 39-D respectivement.

Après broyage UF des tourteaux et séparation électrostatique, les corps protéiques globulaires se trouvent concentrés dans les fractions TxC-FPe-0,1 (Figure 39-A1) et TxT-FPe-0,5 (Figure 39-B1) ; tandis que les particules de pellicules de colza et de coques de tournesol sont récupérées dans les fractions TxC-FNe-0,1 (Figure 39-C1) et TxT-FNe-0,5 (Figure 39-D1), respectivement. Enfin, concernant les fractions obtenues après turbo-séparation, les fractions FF de chaque tourteau sont enrichies en corps protéiques (Figure 39-A2 et 39-B2) et, inversement, les fractions FG contiennent davantage de particules de pellicules ou coques (Figures 39-C2 et 39-D2).

2.1.5. Conclusions

La réalisation d'un broyage adéquat des tourteaux de colza et de tournesol combiné avec des procédés de séparation électrostatique ou de turbo-séparation conduisent à la récupération de fractions enrichies en protéines et en CPT. Cependant, même si la séparation électrostatique permet de récupérer des fractions avec des puretés supérieures en termes de protéines et CPT par rapport à la turbo-séparation, des étapes de recyclages sont nécessaires pour améliorer le rendement de récupération total et arriver à environ 30 %. En outre, les étapes de recyclages entraînent une légère diminution de la teneur en protéines (après chaque étape de recyclage) ainsi qu'une augmentation de la dépense énergétique du procédé. Pour éviter ces étapes de recyclages, des modifications du dispositif pilote peuvent être envisagées comme par exemple, l'augmentation de la surface des électrodes et l'intégration d'un système automatique de récupération en continu des fractions des électrodes.

Nous avons vu par ailleurs que, quels que soient le dispositif de séparation (tri électrostatique ou turbo-séparation), la nature et la granulométrie des tourteaux, les composés phénoliques sont toujours récupérés avec les protéines et se retrouvent concentrés de façon similaire dans les

mêmes fractions. Ceci implique que les composés phénoliques et les protéines sont liés entre eux et qu'ils ne peuvent pas être séparés via des procédés de fractionnement par voie sèche. Cependant, même si ce procédé de fractionnement ne satisfait pas à l'objectif initial de séparation sélective et quantitative des protéines d'un côté et des composés phénoliques de l'autre, il peut néanmoins être envisagé comme une étape de pré-purification en conditions douces avant l'extraction liquide-solide. Par ailleurs, comme le décrivent plusieurs auteurs, l'association des protéines et des composés phénoliques peut être considérée comme un avantage, dans la mesure où ils sont susceptibles d'agir ensemble en tant qu'émulsifiants à forte activité antioxydante. Cette association pourrait être mise à profit également dans le domaine des biomatériaux, dans la mesure où les composés phénoliques (en particulier ceux portant plusieurs noyaux phénoliques ou hydroxyles aromatiques) représentent des agents potentiels de réticulation des protéines endogènes, constituant ainsi une alternative saine et durable aux aldéhydes comme le formol, le glyoxal ou le glutaraldéhyde.

Notons enfin que l'extraction des composés phénoliques des fractions issues des procédés de fractionnement par voie sèche, permet la production simultanée (i) de molécules bioactives (e.g. antioxydants, antimicrobiens, etc.) ou des briques de base pour la synthèse de polymères, et (ii) de fractions dépourvues de composés phénoliques, mieux adaptées à la production d'isolats protéiques ou de peptides ou à l'alimentation animale. Concernant ce dernier point, le choix du solvant d'extraction demeure un élément crucial, en termes d'efficacité, de sélectivité, mais également de toxicité, de durabilité et d'impact environnemental. En ce sens, la recherche d'alternative au méthanol nous a semblé une question importante, notamment dans l'optique d'une valorisation ultérieure des tourteaux après extraction. Le chapitre suivant a donc été consacré à une courte étude de l'extraction des composés phénoliques de tourteaux de colza et de tournesol avec une sélection de mélanges hydro-alcooliques, autres qu'à base de méthanol.

2.2. METHODOLOGIE D'EXTRACTION DES COMPOSES PHENOLIQUES SIMPLES DES TOURTEAUX DE COLZA ET DE TOURNESOL

De nos jours, il existe plusieurs types de méthodologies d'extraction des composés phénoliques des matières végétales. Globalement, les extractions liquide-liquide et solide-liquide (Soxhlet ou

macération) sont les techniques les plus utilisées pour l'extraction des composés phénoliques simples des matières végétales tels que les tourteaux de colza et de tournesol. Le solvant le plus employé est le méthanol ou des mélanges aqueux de méthanol. Cependant ce solvant est considéré comme toxique et non adapté aux usages alimentaires. De ce fait, l'objectif de cette étude a été de trouver un (ou des) solvant(s) « verts » permettant d'extraire la totalité des composés phénoliques présents dans ces tourteaux (ou dans leurs fractions issues du fractionnement par voie sèche) tout en étant (i) compatibles(s) avec des usages alimentaires, (ii) moins toxique(s) et enfin (iii) biosourcé(s) dans la mesure du possible.

Pour cette étude, l'éthanol et l'isopropanol (ou 2-propanol) ont été choisis comme base de mélanges hydro-alcooliques d'extraction. L'éthanol est un solvant biosourcé d'origine végétale, produit industriellement à grande échelle (plus de 100 milliards de litres en 2017, principalement à partir de canne à sucre et de maïs) et utilisé notamment comme biocarburant, et dont la capacité à extraire les composés phénoliques de différentes matières végétales est largement documentée. Pour sa part, l'isopropanol est un solvant aux domaines d'applications très larges, utilisé dans les secteurs alimentaire et pharmaceutique mais également pour l'extraction de produits naturels tels que les composés phénoliques. En outre, ces solvants ne sont pas considérés comme toxiques et sont compatibles avec les applications alimentaires.

2.2.1. Mélanges hydro-alcooliques verts pour l'extraction des composés phénoliques.

Pour cette étude, les tourteaux de colza TxC-0,1 et de tournesol TxT-0,5 ont été choisis en raison de leur profil granulométrique, paramètre important à considérer pour l'extraction des composés phénoliques (Stalikas, 2007) et de leur aptitude à générer des fractions concentrées en composés phénoliques par tri électrostatique ou turbo-séparation, même si leur concentration en CPT n'est pas significativement différente de celle des autres tourteaux (Tableau 22).

Les CPT des tourteaux de colza et de tournesol ont ensuite été extraits avec de l'éthanol (EtOH), de l'isopropanol (iPrOH) en mélange avec de l'eau en proportions diverses (0-25%, v/v). Les résultats obtenus pour le tourteau de colza TxC-0,1 peuvent être observés sur la Figure 40. On pourra constater que la quantité de composés phénoliques extraite augmente avec la teneur en eau du mélange jusqu'à atteindre un maximum, correspondant à une teneur de 15%, (v/v), au-

delà duquel l'ajout d'eau se traduit par une diminution de l'efficacité d'extraction. Ainsi, l'éthanol à 85% permet d'extraire $16,3 \pm 0,9$ mg d'EAS/g MSD et l'iPrOH à 85%, $16,1 \pm 1,6$ mg d'EAS/g MSD.

Ces résultats ne sont pas significativement différents de ceux obtenus avec le méthanol ($16,6 \pm 0,3$ mg d'EAS/g MSD) qui est un solvant plus polaire que l'éthanol et l'isopropanol et permet d'extraire aisément les composés phénoliques polaires du tourteau de colza.

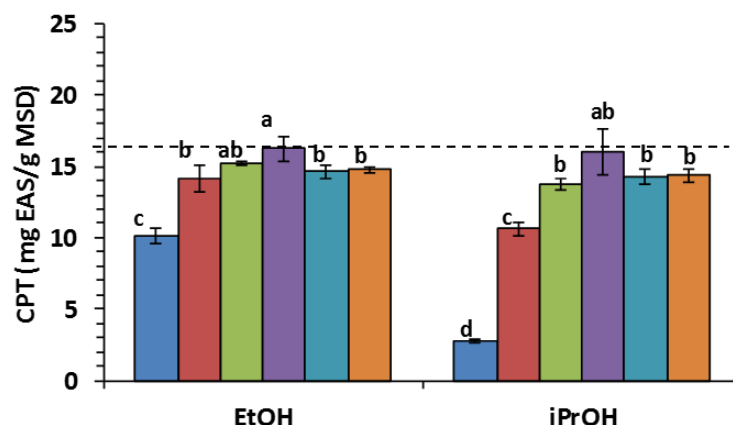


Figure 40 : Extraction des composés phénoliques du tourteau TxC-0,1 avec EtOH et iPrOH en mélange avec de l'eau à différents pourcentages : 0% (■), 5% (■), 10% (■), 15% (■), 20% (■) et 25% (■). Les valeurs sont des moyennes \pm ET (n=3). Les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, $p \geq 0,05$. La ligne en pointillés représente la valeur obtenue après extraction au méthanol pur.

L'ajout de 15% (v/v) d'eau à l'éthanol ou l'isopropanol est donc nécessaire pour obtenir un mélange de polarité et d'efficacité d'extraction équivalentes à celles du méthanol. Au-delà de cette teneur en eau, la polarité trop élevée du mélange se traduit par une moindre efficacité d'extraction.

Pour le tourteau de tournesol, l'évolution de quantité de CPT extraite en fonction de la teneur en eau des mélanges hydro-alcooliques est représentée sur la Figure 41. Contrairement à la situation précédente, l'effet de la teneur en eau sur le rendement d'extraction des composés phénoliques est différent suivant l'alcool considéré. Pour EtOH, un maximum de $23,7 \pm 0,1$ mg d'EAC/g MSD est atteint avec 20% d'eau, teneur au-delà de laquelle une diminution des CPT extraits est

observée. Pour iPrOH, en revanche, le maximum n'est pas atteint et la valeur maximale de récupération en CPT est de $21,5 \pm 0,1$ mg d'EAC/g MSD pour le mélange à 25% d'eau.

Ces résultats peuvent s'expliquer par la nature des composés phénoliques présents dans le tourteau de tournesol. Il s'agit en effet d'esters d'acide caféique et d'acide quinique (de polarité supérieure à celle de l'acide sinapique ou de ses dérivés) qui requièrent des solvants plus polaires, et donc des mélanges hydro-alcooliques à teneur en eau plus élevée, pour pouvoir être solubilisés.

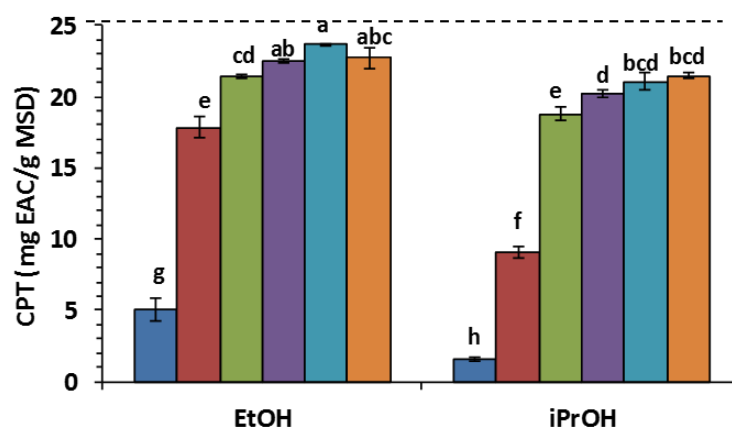


Figure 41 : Extraction des composés phénoliques du tourteau TxT-0,5 avec EtOH et iPrOH en mélange avec de l'eau à différents pourcentages : 0% (■), 5% (■), 10% (■), 15% (■), 20% (■) et 25% (■). Les valeurs sont des moyennes \pm ET (n=3). Les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, $p \geq 0,05$. La ligne en pointillés représente la valeur obtenue après extraction au méthanol pur.

Finalement, au regard des critères de sélection énoncés en introduction de ce chapitre, l'éthanol représente le solvant de choix pour l'extraction des composés phénoliques, en mélange à 15% d'eau pour le colza et à 20% d'eau pour le tournesol.

2.2.2. Conclusions

Bien que sommaires, les quelques résultats obtenus dans cette partie nous ont permis d'identifier des mélanges hydro-alcooliques à base d'éthanol, adaptés à l'extraction quantitative des composés phénoliques simples des tourteaux de colza et de tournesol et susceptibles de remplacer le méthanol. Cependant, la présence d'eau dans ces mélanges peut favoriser

l'extraction d'autres composés polaires (sucres, minéraux, peptides et protéines de petites tailles) et rendre plus complexes les étapes ultérieures de purification des composés phénoliques.

De plus, ces mélanges pourraient également appauvrir les tourteaux en composés d'intérêt nutritionnel. Afin de conclure définitivement quant à l'intérêt de ces mélanges hydro-alcooliques, il conviendrait donc de caractériser (composition et teneurs) les composés indésirables dans les extraits, puis d'évaluer leur impact sur les procédés de purification des CP, et la qualité nutritionnelle des tourteaux résultants de l'extraction. En outre, ces travaux exploratoires mériteraient d'être complétés par une étude plus exhaustive traitant notamment de l'influence d'autres paramètres opératoires (fixés dans le cas de notre étude) comme la température ou le ratio solide/liquide, mais également de leur efficacité à extraire les composés phénoliques des fractions issues du fractionnement par voie sèche et caractérisés par des concentrations élevées en CPT.

PARTIE 3. TRAITEMENTS ENZYMATIQUES DES TOURTEAUX DE COLZA ET DE TOURNESOL POUR LA PRODUCTION D'ACIDES SINAPIQUE ET CAFÉIQUE

Les acides phénoliques sont des molécules bioactives avec des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires ou même antimicrobiennes. En raison de leur structure et de leur réactivité, les acides phénoliques et leurs dérivés de type vinyl-phénols font l'objet d'un intérêt croissant depuis quelques années, notamment en tant que nouveaux additifs ou précurseurs de polymères (Aouf *et al.*, 2012; Hollande *et al.*, 2018; Reano *et al.*, 2015; Zago *et al.*, 2015a). Par conséquent, toute matière première et type de procédé permettant la production et la récupération d'acides phénoliques à grande échelle pourrait être bénéfique pour le développement des biomatériaux ou pour leurs utilisations en tant que molécules bioactives. De ce fait, les tourteaux de colza et de tournesol (ainsi que leurs fractions issues du fractionnement par voie sèche) pourraient être avantageusement utilisés comme sources d'acides phénoliques, ces tourteaux étant par ailleurs des matières premières abondantes, peu chères et, à part quelques rare exceptions (Kreps *et al.*, 2014; Odinot *et al.*, 2017), très peu utilisées à ces fins jusqu'à présent.

Comme mentionné dans la **partie 1.1** de ce chapitre, la fraction phénolique des tourteaux de colza et de tournesol est principalement constituée d'esters d'acide sinapique pour le colza et d'esters d'acide caféique pour le tournesol. De ce fait, pour accéder aux acides phénoliques correspondants, il est nécessaire d'appliquer des procédés d'hydrolyse qui peuvent être de deux types : chimique ou enzymatique.

Généralement, l'hydrolyse par voie chimique des esters issus des biomasses est réalisée dans des conditions de pH élevées avec de la soude (NaOH) ou de la potasse (KOH) et elle permet l'hydrolyse efficace et non-sélective de tous les esters présents (Benoit *et al.*, 2006). Concernant ce dernier point, plusieurs études ont déjà montré l'efficacité de ce type de procédé pour l'hydrolyse des esters d'acides phénoliques des tourteaux de colza et de tournesol (De Leonardis *et al.*, 2005; Vuorela *et al.*, 2003). Néanmoins, les conditions de pH élevé peuvent conduire à la dégradation de certains composés phénoliques par des réactions d'oxydation de leurs cycles phénoliques et former des *o*-quinones (Ozdal *et al.*, 2013; Wildermuth *et al.*, 2016). En revanche,

les procédés enzymatiques alliant conditions réactionnelles douces et sélectivité d'action, représentent une alternative intéressante aux procédés chimiques agressifs. Dans ce contexte, et tel qu'il a été exposé dans la **partie 4 du chapitre 1 « Etat de l'art »**, les enzymes les plus efficaces pour l'hydrolyse des esters d'acides hydroxycinnamiques sont les cinnamoyl estérases.

Les cinnamoyl estérases sont des enzymes appartenant à la famille des esters carboxyliques hydrolases. Elles sont capables d'hydrolyser les esters d'acides phénoliques tels que les esters d'acide sinapique ou d'acide caféique. Récemment, Odinet *et al.* (2017) ont étudié l'hydrolyse *in situ* des esters d'acide sinapique dans un tourteau industriel de colza en utilisant une feruloyl estérase recombinante d'*Aspergillus niger* de type-A (AnFaeA). Dans les meilleures conditions (concentration en enzyme de 39 nkat/g de tourteau, 55°C et pH 5,5), l'enzyme AnFaeA a permis d'hydrolyser la plupart des esters phénoliques avec des rendements d'hydrolyse compris entre 68% et 76%.

Dans le cadre de cette thèse, et en complément des travaux cités précédemment, nous nous sommes intéressés cette fois à l'hydrolyse enzymatique des esters d'acide caféique d'un tourteau de tournesol industriel (c.a.d non décortiqué et traité thermiquement). Les enzymes choisies pour cette étude ont été une feruloyl estérase recombinante d'*Aspergillus niger* de type-B (AnFaeB) et une chlorogénate estérase d'*Aspergillus niger* (ChIE) en raison de leurs fortes activités hydrolytiques envers les dérivés d'acide caféique. Même si diverses études ont démontré la capacité de ces enzymes à hydrolyser les esters d'acide caféiques présents dans d'autres matières premières telles que la pulpe de café, le marc de pomme ou la pulpe de betterave (Benoit *et al.*, 2006; Gopalan *et al.*, 2015), elles n'ont jamais été utilisées sur un tourteau de tournesol.

Dans un premier temps, nous avons déterminé la concentration optimale de ces deux enzymes, les conditions optimales de pH et de température ayant été fixées respectivement à 6,0 et 50°C d'après les données de la littérature (Asther *et al.*, 2005; Benoit *et al.*, 2006).

Dans un deuxième temps, nous avons appliqué les **conditions enzymatiques optimales** déterminées précédemment par Odinet *et al.* (2017) à l'**hydrolyse de tourteaux non-industriels de colza et de tournesol** en raison de leurs fortes concentrations en CPT par rapport aux tourteaux industriels. L'hydrolyse enzymatique a également été réalisée sur l'**extrait**

méthanolique sec de chacun de ces tourteaux non-industriels. En effet, la mise en œuvre d'un extrait présente les avantages (i) de s'affranchir d'éventuels effets de matrice apportés par le tourteau et, (ii) de mieux contrôler la concentration en composés phénoliques et en enzyme et les volumes réactionnels.

Pour tous les tourteaux et extraits, l'efficacité et la sélectivité des enzymes ont été évaluées au travers de l'évolution des concentrations en composés phénoliques individuels (esters et acide phénolique libéré) et totaux (CPT) au cours du temps (cinétiques de 4h). Les rendements d'hydrolyse ou les pertes en CPT ont été déterminés à partir de valeurs de référence correspondant à la quantité totale d'acide phénolique potentiellement libérable par gramme de substrat.

3.1. DETERMINATION DES TENEURS REFERENCES EN DERIVES D'ACIDES PHENOLIQUES TOTAUX DES TOURTEAUX DE COLZA ETE DE TOURNESOL

Les teneurs initiales des principaux composés phénoliques individuels et des CPT dans les divers échantillons de colza et de tournesol ont été présentées en **section 1.1**. Dans cette partie de l'étude, la teneur en composés phénoliques totaux des échantillons de colza a été définie comme étant la teneur en dérivés d'acide sinapique totaux (DAST) du fait que 98% de ses composés phénoliques sont des esters d'acide sinapique (Khattab *et al.*, 2010; Siger *et al.*, 2013). Concernant le tournesol, elle a été définie comme étant la teneur en dérivés d'acide caféique totaux (DACT) du fait que 95 % de ses composés phénoliques sont des esters de l'acide caféique (Karamać *et al.*, 2012; Weisz *et al.*, 2009). Les résultats ont été ainsi exprimés en μmol d'EAS/g MSD et en μmol d'équivalent d'acide caféique (d'EACa)/g MSD respectivement pour les échantillons de colza et de tournesol. Les résultats obtenus peuvent être visualisés dans le Tableau 26. Ainsi, les différentes valeurs obtenues pendant les étapes d'hydrolyse (alcaline ou enzymatique) pourront être comparées sur la base du nombre de moles d'acide phénolique libéré.

La quantité d'acide sinapique initialement présente dans les tourteaux de colza sous forme de conjugués solubles (éventuellement liés au réseau lignocellulosique) et potentiellement libérable a été déterminée après hydrolyse alcaline. Elle est de $62,5 \pm 1,2 \mu\text{mol EAS/g MSD}$ pour le tourteau non-industriel et de $46,8 \pm 3,0 \mu\text{mol EAS/g MSD}$ pour le tourteau industriel (Tableau 26).

	Tourteau non-industriel		Tourteau industriel	
Colza	Extrait MeOH	Après hydrolyse alcaline	Extrait MeOH	Après hydrolyse alcaline
Sinapine (μmol EAS/g MSD)	31,7 ± 0,7 ^c	--	21,6 ± 0,2 ^d	--
Acide sinapique (μmol/g MSD)	3,9 ± 0,1 ^e	62,5 ± 1,8 ^a	2,2 ± 0,0 ^f	46,8 ± 3,0 ^b
DAST (μmol EAS/g MSD)	64,2 ± 1,2 ^a	62,5 ± 1,8 ^a	44,8 ± 0,2 ^b	46,8 ± 3,0 ^b
Tournesol	Extrait MeOH	Après hydrolyse alcaline	Extrait MeOH	Après hydrolyse alcaline
Acide chlorogénique (μmol EACa/g MSD)	55,8 ± 0,9 ^b	n.d.	41,4 ± 2,5 ^c	n.d.
Acide caféique (μmol/g MSD)	1,2 ± 0,0 ^e	n.d.	2,1 ± 0,5 ^d	n.d.
DACT (μmol EACa/g MSD)	71,7 ± 0,5 ^a	n.d.	57,4 ± 1,5 ^b	n.d.

Tableau 26 : Principaux composés phénoliques individuels et dérivés d'acide sinapique totaux (DAST) [ou dérivés d'acide caféique totaux (DACT)] des tourteaux de colza (ou de tournesol) industriels et non-industriels. Les valeurs sont des moyennes ± ET (n=3). Pour chaque matière première (colza ou tournesol), les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, $p \geq 0,05$. n. d. : non déterminé.

Ces valeurs ne sont pas significativement différentes des valeurs de DAST obtenues après extraction methanolique ($64,2 \pm 1,2$ μmol d'EAS/g MSD et $44,8 \pm 0,2$ μmol EAS/g MSD respectivement) ce qui signifie que tous les esters d'acide sinapique présents dans les tourteaux ont été hydrolysés. Contrairement aux pertes significatives en composé phénoliques observées par Vuorela *et al.* (2003) après hydrolyse alcaline (NaOH 4M, 37°C 4h), les conditions plus douces employées dans notre étude (NaOH 2M, 30°C, 30 min) ont permis d'éviter tout type de dégradation de l'acide sinapique ou de ses dérivés. Finalement, ces résultats montrent également que pour le tourteau de colza, les acides phénoliques se trouvent tous sous forme d'esters d'acide sinapique libre, c'est-à-dire non estérifiés au réseau ligno-cellulosique ou à la matrice cellulaire du fait que les valeurs en DAST avant et après hydrolyse alcaline ne sont pas significativement différentes. Ces valeurs, représentant la quantité totale d'acide sinapique potentiellement libérable par gramme de tourteau délipidé sec, ont été utilisées pour les calculs des rendements d'hydrolyse après traitements enzymatiques avec AnFaeA.

Par la suite, le même traitement alcalin (NaOH 2M, 30°C, 30 min) a été appliqué aux tourteaux de tournesol afin de déterminer la quantité d'acide caféique potentiellement libérable initialement présente dans les tourteaux. Contrairement au cas précédent, aucune trace d'acide caféique n'a pas pu être détectée (Tableau 26) malgré les conditions modérées du traitement alcalin. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'acide caféique et ses dérivés peuvent subir une auto-oxydation dans des conditions élevées de pH en raison de la présence de deux groupements hydroxyles adjacents sur le cycle aromatique (noyau catéchol). Ces groupements peuvent en effet réagir rapidement avec la soude et s'oxyder en présence d'autres espèces oxydantes réactives (Wildermuth *et al.*, 2016). Par conséquent, étant donné que l'hydrolyse alcaline n'a pas permis de déterminer la quantité totale d'acide caféique potentiellement libérable, nous avons pris pour référence la valeur en DACT après extraction méthanolique. Cette valeur, établie à $71,7 \pm 0,5$ $\mu\text{mol EACa/g MSD}$ pour le tourteau non-industriel et à $57,4 \pm 1,5$ $\mu\text{mol EACa/g MSD}$ pour le tourteau industriel, a été utilisée pour les calculs des rendements d'hydrolyse après traitements avec les enzymes AnFaeB et ChIE.

3.2. TRAITEMENTS ENZYMATIQUES DU TOURTEAU DE TOURNESOL INDUSTRIEL : OPTIMISATION DE LA CONCENTRATION EN ENZYMES ANFAEB ET CHLE

Les cinétiques d'hydrolyse des principaux esters d'acide caféique du tourteau industriel de tournesol ainsi que la cinétique de libération d'acide caféique dans le milieu sont présentées en Figure 42 pour les deux enzymes AnFaeB et ChIE.

Hydrolyse avec l'enzyme AnFaeB

D'après la Figure 42, une quantité minimale d'enzyme de 20 nkat/g de tourteau est nécessaire pour hydrolyser totalement l'ensemble des esters d'acide caféique, et ce, en moins d'une heure. La concentration maximale en d'acide caféique ($59,8 \pm 2,1$ $\mu\text{mol/g MSD}$) est obtenue après 3 h d'incubation pour une concentration d'enzyme de 30 nkat/g MSD, ce qui correspond à un rendement d'hydrolyse de 104 % (calculé par rapport à DACT initiale dans le tourteau industriel de tournesol - Tableau 26). On pourra également noter sur le chromatogramme de la Figure 43-A, la résistance à l'hydrolyse du 3-CQA et la capacité de l'enzyme AnFaeB à hydrolyser d'autres dérivés d'acide quinique tels les acides 5-féruloylquinique et 5-coumaroylquinique.

Hydrolyse avec l'enzyme ChIE

En présence de l'enzyme ChIE, l'hydrolyse des acides 3,5-dicaféoylquinique (3,5-di-CQA) et 4,5-dicaféoylquinique (4,5-di-CQA) est achevée après 3 h d'incubation, quelle que soit la quantité d'enzyme mise en œuvre.

En revanche, bien que la conversion de l'acide chlorogénique soit plus rapide, le taux d'hydrolyse n'excède pas 90 % (atteint au bout de 2h), y compris aux plus fortes concentrations en enzyme (Figure 42-A1). Quant à l'acide 3-CQA, ChIE s'avère totalement inactive vis-à-vis de ce composé dont la concentration moyenne ($6,1 \pm 0,3 \mu\text{mol EAC/g MSD}$) reste invariable au cours du temps (Figure 42-A2). Enfin, concernant la quantité maximale d'acide caféique produite, autour de $54,0 \pm 1,1 \mu\text{mol/g MSD}$, elle est obtenue entre 2h et 4 h d'incubation et pour des concentrations en enzyme supérieures à 10 nkat/g de tourteau. Cette plus faible concentration en fin d'hydrolyse, comparée à celle obtenue avec AnFaeB ($59,8 \pm 2,1 \mu\text{mol/g MSD}$), peut s'expliquer par l'incapacité qu'a l'enzyme ChIE à hydrolyser l'acide 3-CQA. Comme l'illustre le chromatogramme en Figure 43-B, le pic correspondant à l'acide 3-CQA reste inchangé après 240 min d'incubation avec la concentration maximale en ChIE de 30 nkat/g de tourteau. On pourra remarquer également l'activité hydrolytique de ChIE sur les acides 5-féruloylquinique et 5-coumaroylquinique, dont les pics ont quasiment disparu après 4h d'incubation.

A notre connaissance, ces travaux révèlent pour la première fois l'activité hydrolytique des enzymes AnFaeB et ChIE envers différents isomères d'acides mono- et di-caféoylquiniques. En effet, cette étude a montré clairement la sélectivité de l'enzyme ChIE envers les différents dérivés d'acides caféiques de tournesol alors que l'enzyme AnFaeB s'est avérée non discriminante. On pourra noter également que, en présence ou absence (contrôle) d'enzyme, la teneur en DACT est restée stable au cours des deux cinétiques d'hydrolyse ($54,9 \pm 2,9 \mu\text{mol d'EACa/g MSD}$).

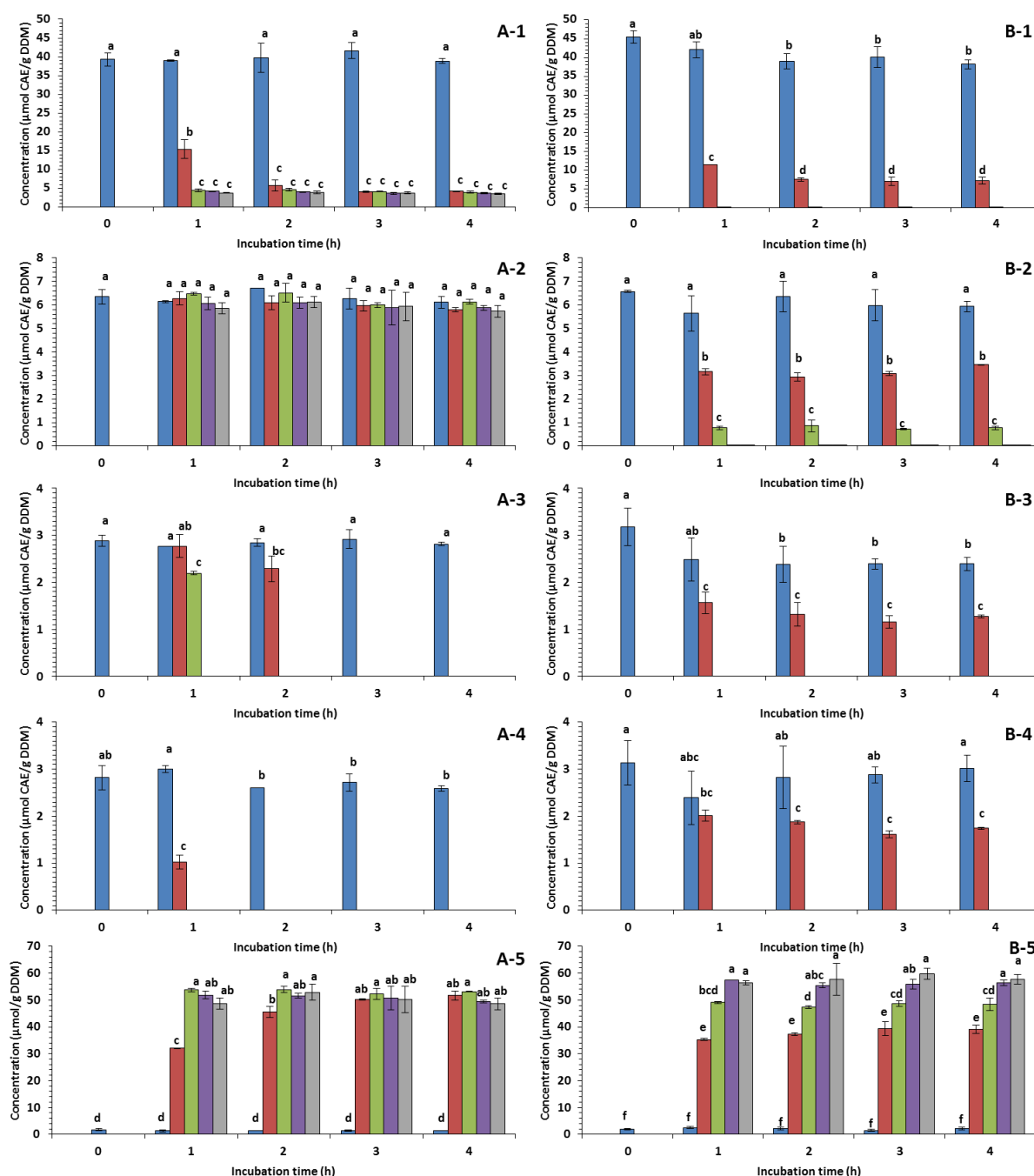


Figure 42 : Cinétiques d'hydrolyse des esters d'acide caféique présents dans le tourteau industriel de tournesol avec différentes concentrations en ChIE (A) et AnFaeB (B) : 0 nkat/g (■); 5 nkat/g (■); 10 nkat/g (■); 20 nkat/g (■) et 30 nkat/g (■). Acide caféique et dérivés : acide chlorogénique (1); 3-CQA (2); 3,5-diCQA (3), 4,5-diCQA (4) et acide caféique (5). Conditions d'hydrolyse : pH 6, T = 50°C. Les valeurs sont des moyennes ± ET (n=2). Pour chaque composé, les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, $p \geq 0,05$.

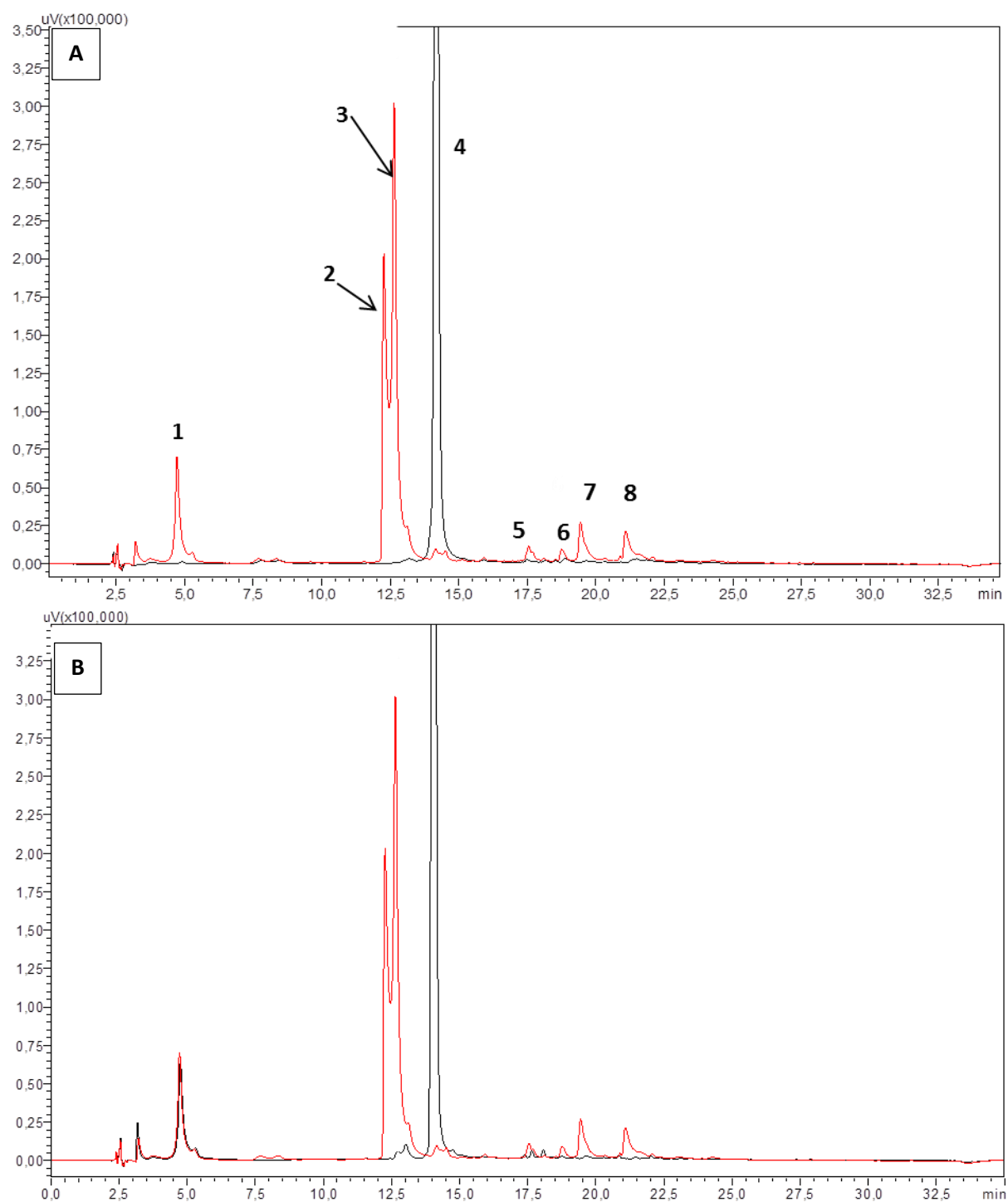


Figure 43 : Chromatogrammes obtenus après hydrolyse enzymatique en présence de 20 nkat de AnFaEB/g de tourteau (A) et 30 nkat de ChIE/g de tourteau (B) à t = 0 min (rouge) et t = 240 min (noir) à 326 nm. Acide 3-*O*-caffeoylquinique (3-CQA) (1), acide 4-*O*-caffeoylquinique (4-CQA) (2), acide 5-*O*-caffeoylquinique (5-CQA) (3), acide caféique (4), acide 5-*O*-coumaroylquinique (5-CoQA) (5), acide 5-*O*-feruloylquinique (5-FQA)(6), acide 3,5-Di-*O*-caffeoylquinique (3,5-di-CQA) (7) et 4,5-Di-*O*-caffeoylquinique (4,5-di-CQA) (8).

Cette teneur qui n'est pas significativement différente de la DACT initiale dans le tourteau ($57,4 \pm 1,5 \mu\text{mol EACa/g MSD}$) signifie qu'il n'y a pas ou peu eu de dégradation des composés phénoliques dans les conditions d'hydrolyse. Ces résultats ne peuvent être cependant extrapolés à d'autres matières premières puisque, comme cela a pu être démontré dans d'autres études, l'activité et la sélectivité d'une enzyme peuvent être sensiblement affectées par la nature de la matrice dans laquelle elle est mise en œuvre (Benoit *et al.*, 2006, 2007)

En conclusion, nous avons choisi pour la suite de l'étude les concentrations optimales de 30 nkat/g de tourteau pour l'enzyme AnFaeB, et de 10 nkat/g de tourteau pour l'enzyme ChIE, concentrations pour lesquelles une production maximale d'acide caféique est obtenue en moins de 2 heures.

3.3. HYDROLYSE ENZYMATIQUE DU TOURTEAU DE TOURNESOL NON-INDUSTRIEL ET DE SON EXTRAIT METHANOLIQUE SEC CORRESPONDANT, AVEC LES ENZYMES AnFaeB ET ChIE.

Dans cette partie de l'étude, nous avons cherché à déterminer l'effet de la matrice sur l'activité hydrolytique des enzymes AnFaeB et ChIE. Pour cela, nous avons suivi les cinétiques d'hydrolyse des esters d'acide caféique dans un tourteau tournesol non-industriel et dans son extrait méthanolique sec, en conditions optimales de pH, température et concentration des deux enzymes.

3.3.1. Hydrolyse enzymatique du tourteau non-industriel de tournesol avec AnFaeB et ChIE

Sur la Figure 44, sont présentées les cinétiques d'hydrolyse enzymatique du tourteau non-industriel de tournesol à 50°C et pH 6, avec de 30 nkat de AnFaeB/g de tourteau (A) et de 10 nkat de ChIE/g de tourteau (B).

Remarque : pour rappel, la procédure de traitement comporte deux étapes : la première, dénommée « étape de pré-incubation », qui consiste en la mise en suspension du substrat (tourteau ou extrait) dans du tampon MOPS et son homogénéisation pendant 30 min à la température de consigne, et la deuxième, étape dite « d'incubation », correspondant à l'hydrolyse proprement dite, après ajout de l'enzyme.

Dans les graphes, le temps t=0 correspond donc à l'état du système après pré-incubation et non au tourteau ou à l'extrait de départ.

Alors que l'acide chlorogénique est totalement converti après 10 min d'incubation en présence de l'enzyme AnFaeB, l'hydrolyse de ce composé s'avère incomplète avec ChIE. D'autre part, la concentration la plus importante en acide caféique libérée dans le milieu réactionnel est observée après 30 min d'incubation avec AnFaeB ($52,3 \pm 0,2 \mu\text{mol/g MSD}$) mais aussi avec ChIE ($42,0 \pm 1,1 \mu\text{mol/g MSD}$). Ces valeurs restent néanmoins plus faibles que la quantité initiale d'acide chlorogénique présente dans le tourteau, soit $55,8 \pm 0,9 \mu\text{mol/g MSD}$ (Tableau 26). En outre, il peut être constaté au cours du temps et indépendamment de l'enzyme, une forte diminution de la teneur en DACT (par rapport à la valeur initiale déterminée dans le tourteau - Tableau 26) qui intervient dès l'étape de pré-incubation. Cette baisse de la teneur en DACT, qui pourrait être due à des facteurs tels que la température ou le pH, n'est pas observée lorsque l'hydrolyse enzymatique est réalisée sur le tourteau industriel de tournesol comme cela a été évoqué précédemment en **section 3.2**.

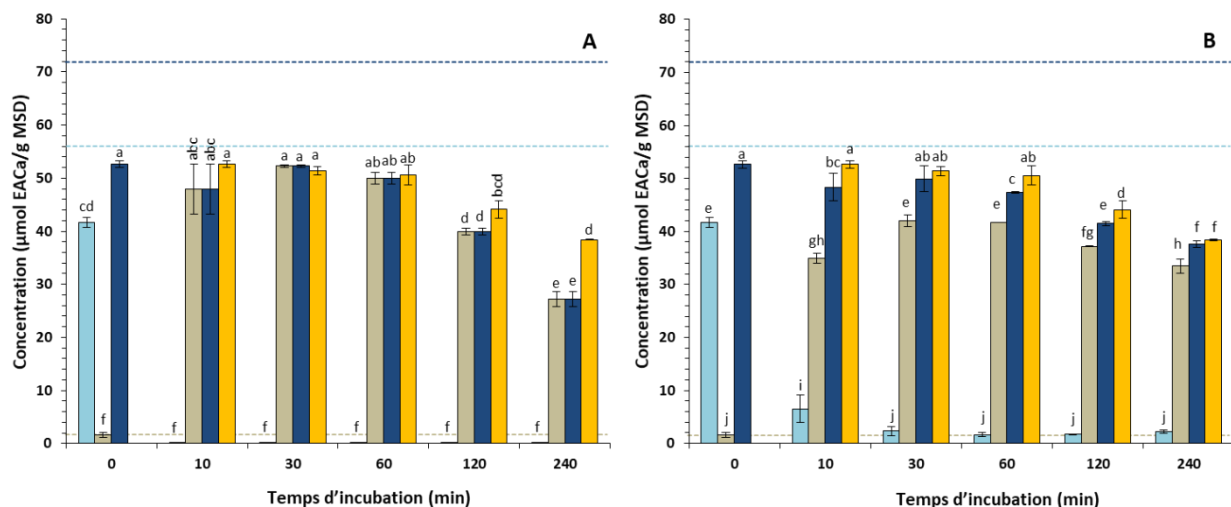


Figure 44 : Cinétiques d'hydrolyse du tourteau de tournesol non-industriel avec à 30 nkat de AnFaeB/g de tourteau (A) et 10 nkat de ChIE/g de tourteau (B), à 50°C et pH6. Evolution au cours du temps des teneurs en acide chlorogénique (■), acide caféique (■) et DACT [avec Enzyme (■), contrôle (■)]. Les lignes en pointillés représentent les teneurs initiales dans le tourteau : acide chlorogénique (■), acide caféique (■) et DACT (■). Les valeurs sont des moyennes ± ET (n=2). Pour chaque enzyme, les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, $p \geq 0,05$.

De ce fait, une explication possible à cette perte serait la présence dans le tourteau non-industriel d'enzymes endogènes actives, telles que les polyphénol oxydases (PPO), capables d'oxyder l'acide chlorogénique ou ses dérivés pendant les étapes de pré-incubation, puis d'incubation. En effet, la présence de ces enzymes a déjà été mise en évidence par Wildermuth *et al.* (2016), qui ont déterminé, pour ces enzymes, des conditions optimales de pH et de températures de 7,5 et 45°C respectivement. Bien que les conditions d'hydrolyse mises en œuvre dans notre travaux (pH 6, 50°C) ne correspondent pas aux conditions optimales des PPO, nous pouvons néanmoins supposer que dans ces conditions la PPO conserve une activité résiduelle suffisante pour oxyder l'acide chlorogénique et ses dérivés dès l'étape de pré-incubation et jusqu'à la fin de l'hydrolyse (240min).

Indépendamment de l'enzyme, ce phénomène de dégradation des composés phénoliques à l'œuvre dans le tourteau non-industriel de tournesol se traduit par une quantité maximale d'acide caféique libre inférieure à celle obtenue avec le tourteau industriel ($52,3 \pm 0,2 \mu\text{mol/g MSD}$ versus $59,8 \pm 2,1 \mu\text{mol/g MSD}$ pour AnFaeB, et $42,0 \pm 1,1 \mu\text{mol/g MSD}$ versus $54,0 \pm 1,1 \mu\text{mol/g MSD}$ pour ChIE), et ceci en dépit d'une teneur initiale en DACT nettement supérieure (tourteau non-industriel : $71,7 \pm 0,5 \mu\text{mol EACa/g MSD}$; tourteau industriel : $57,4 \pm 1,5 \mu\text{mol EACa/g MSD}$).

Or, comme nous l'avons évoqué précédemment en **section 3.2**, ce phénomène de dégradation des composés phénoliques n'est pas observé lors de l'hydrolyse du tourteau industriel, ce qui démontre clairement la désactivation des enzymes endogènes lors des traitements thermiques subis par ce tourteau. Pour conclure, ces dégradations constituent un problème majeur qui limite l'intérêt des tourteaux non-industriels en tant que substrats pour la production enzymatique *in situ* d'acide caféique.

3.3.2. Hydrolyse enzymatique de l'extrait méthanolique sec de tourteau de tournesol non-industriel avec AnFaeB et ChIE

Outre le fait que le méthanol pur permet une récupération totale des composés phénoliques présents dans le tourteau de tournesol (ainsi que d'autres composés polaires mineurs), il est supposé limiter l'extraction des protéines et, si le cas venait à se produire, les inactiver dans les conditions de température mises en œuvre dans notre étude (75°C). De ce fait, il est attendu un

extrait exempt d'activité enzymatique oxydative et donc une réduction drastique de la dégradation des composés phénoliques lors du traitement de l'extrait par les enzymes AnFaeB et ChIE dans les mêmes conditions que précédemment (**section 3.3.1**).

Hydrolyse de l'extrait à 50°C

Les cinétiques d'hydrolyse enzymatique de l'extrait à 50°C sont reportées sur les Figures 45-A, 46-A et 47-A.

Concernant l'enzyme AnFaeB (Figure 45-A), la totalité des esters d'acides caféiques présent dans l'extrait est hydrolysée après seulement dix minutes d'incubation, ce qui conduit à une teneur en acide caféique libérée de $68,1 \pm 1,7 \mu\text{mol/g MSD}$.

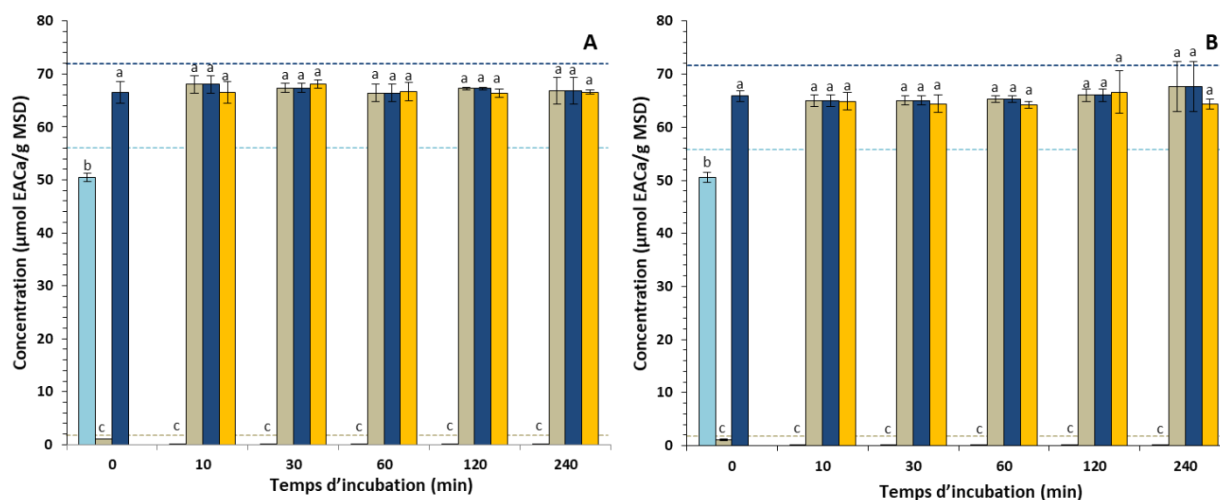


Figure 45 : Cinétiques d'hydrolyse de l'extrait méthanolique de tournesol non-industriel avec 30 nkat de AnFaeB/g de tourteau à 50°C (A) et 37°C (B). Evolution au cours du temps des teneurs en acide chlorogénique (■), acide caféique (■) et DACT [avec Enzyme (■), contrôle (■)]. Les lignes en pointillés représentent les teneurs initiales dans l'extrait : acide chlorogénique (---), acide caféique (---) et DACT (---). Les valeurs sont des moyennes \pm ET (n=2). Les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, $p \geq 0,05$.

Lorsque l'enzyme ChIE est utilisée à la même température (50°C), l'hydrolyse de l'acide chlorogénique est plus lente et même incomplète après 240 min, alors qu'une faible quantité d'acide 3-caféoylquinique est hydrolysée (Figure 46-A). Cette particularité de l'enzyme ChIE, déjà observée pendant l'étape d'optimisation réalisée précédemment (**Section 3.2**), explique pourquoi la concentration en acide caféique libéré n'excède pas $55,4 \pm 0,3 \mu\text{mol/g MSD}$. D'autre

part, il est intéressant de noter que, quelle que soit l'enzyme, la diminution en DACT de l'ordre de 5-8% est bien plus faible que les 27% observés lors de l'hydrolyse du tourteau correspondant.

En outre, la teneur en DACT étant stable tout au long des cinétiques d'hydrolyse, cela signifie que la perte observée a eu lieu pendant l'étape de pré-incubation, avant ajout de l'enzyme. Ces résultats confirment, de manière indirecte, la présence d'enzymes endogènes de dégradation des composés phénoliques (telles que des PPO) dans le tourteau et, en corolaire, leur absence ou leur inactivité dans l'extrait méthanolique.

Hydrolyse de l'extrait à 37°C

L'hydrolyse de l'extrait méthanolique sec a été ensuite réalisée à 37°C, afin d'évaluer l'impact éventuel de la température sur la dégradation des composés phénoliques et la baisse de la teneur en DACT. Les résultats obtenus peuvent être observés sur les Figures 45-B, 46-B et 47-B.

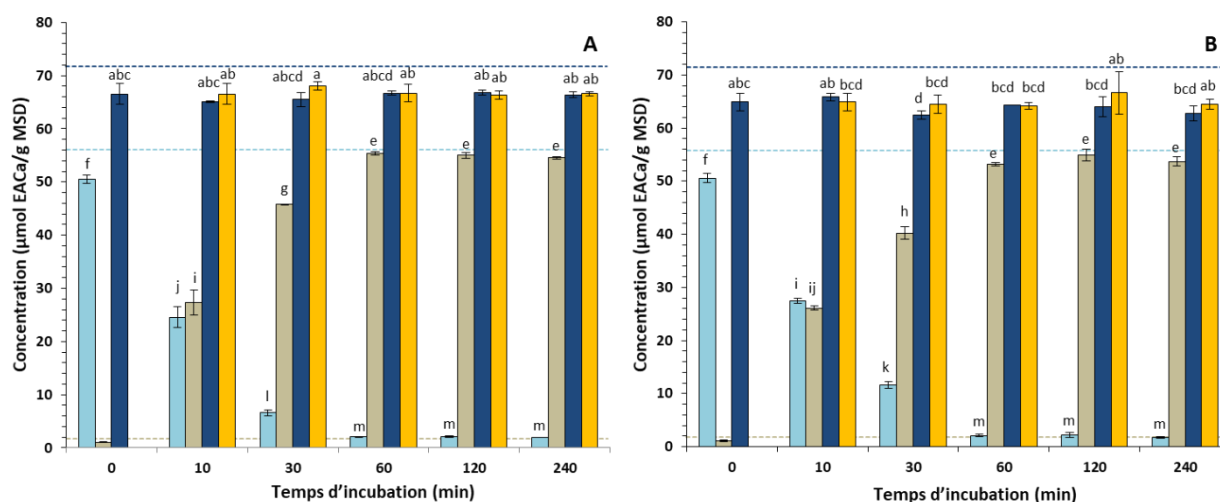


Figure 46 : Cinétiques d'hydrolyse de l'extrait méthanolique de tournesol non-industriel avec 10 nkat de ChIE /g de tourteau à 50°C (A) et 37°C (B). Evolution au cours du temps des teneurs en acide chlorogénique (■), acide caféique (■) et DACT [avec Enzyme (■), contrôle (■)]. Les lignes en pointillés représentent les teneurs initiales dans l'extrait : acide chlorogénique (■■■■), acide caféique (■■■■) et DACT (■■■■). Les valeurs sont des moyennes ± ET (n=2). Les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, $p \geq 0,05$.

On pourra tout d'abord constater, avec AnFaeB, l'hydrolyse totale des esters d'acide caféique en 10 min, ce qui confirme la forte activité de cette enzyme à une température plus faible que sa température optimale.

Concernant les résultats obtenus avec ChIE, les cinétiques d'hydrolyse de la plupart des esters d'acide caféique ne sont pas significativement différentes de celles à 50°C (Figures 46 et 47) et la baisse de teneur en DACT, de 6 % environ, est du même ordre de grandeur que celle observée à 50°C. Il est donc raisonnable de penser que la température a un rôle négligeable dans la dégradation des composés phénoliques et que les causes, qui restent encore à élucider, sont à chercher ailleurs.

Nous avons résumé dans le Tableau 27 les meilleurs résultats d'hydrolyse des esters d'acide caféique avec les enzymes ChIE et AnFaeB, obtenus après traitement (i) du tourteau industriel de tournesol et (ii) de l'extrait méthanolique de tourteau non-industriel de tournesol. Concernant ce dernier, seuls les résultats à 50°C ont été pris en compte du fait de l'absence de différence significative par rapport aux données à 37°C (Figures 45, 46 et 47).

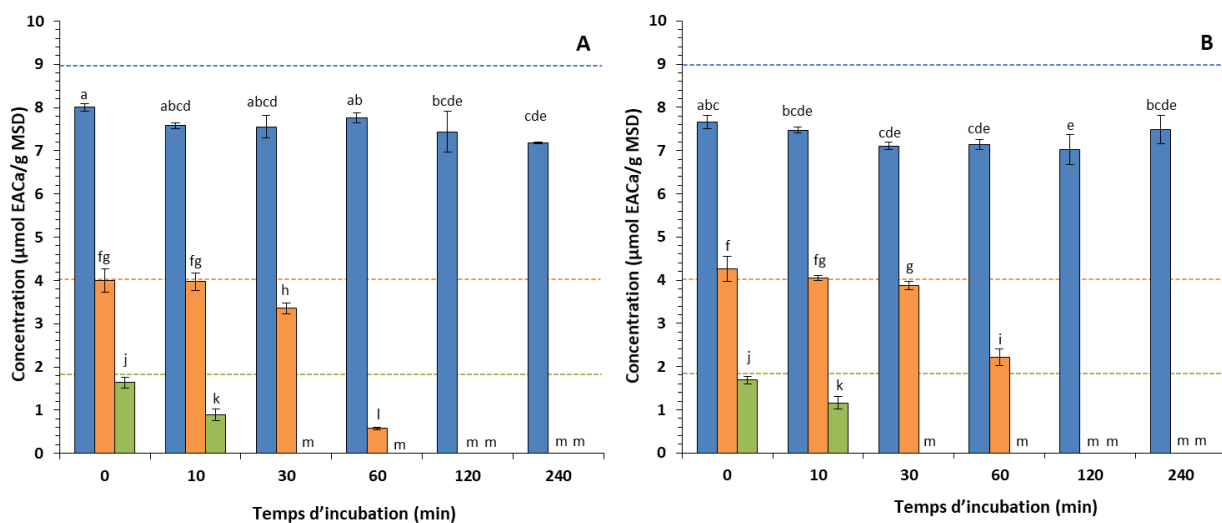


Figure 47 : Cinétiques d'hydrolyse des différents esters d'acides caféiques présents dans l'extrait méthanolique de tourteau de tournesol non-industriel avec 10 nkat de ChIE /g de tourteau à 50°C (A) et 37°C (B). 3-CQA (■), 3,5-di-CQA (■) et 4,5-di-CQA (■). Les valeurs sont des moyennes ± ET (n=2). Les lignes en pointillés représentent les teneurs initiales dans l'extrait de 3-CQA (■■■■), 3,5-di-CQA (■■■■) et 4,5-di-CQA (■■■■). Les valeurs sont des moyennes ± ET (n=2). Les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, $p \geq 0,05$.

Il est important de noter que les rendements en acide caféique, ou rendements d'hydrolyse, ont été calculés de deux façons différentes : soit à partir des teneurs initiales en DACT avant traitement, soit à partir des teneurs en DACT après pré-incubation et avant ajout de l'enzyme

($t=0$). Dans le premier cas le calcul donne accès à un « **rendement global** », alors que dans le deuxième il rend compte plus spécifiquement de l'efficacité des enzymes à hydrolyser les esters d'acides caféique réellement présents dans le milieu. Nous l'avons donc dénommé « **rendement spécifique** », par opposition au précédent.

Hydrolyse réalisée avec ChIE à 50°C	Tourteau Industriel de tournesol	Extrait de tourteau non-industriel de tournesol
Teneur en DACT à $t = 0$ ($\mu\text{mol EACa/g MSD}$)	$59,9 \pm 1,7$	$66,5 \pm 2,0$
Teneur initiale en DACT dans le tourteau ($\mu\text{mol EACa/g MSD}$)	$57,4 \pm 1,5$	$71,7 \pm 0,5$
Teneur maximale en acide caféique après hydrolyse ($\mu\text{mol/g MSD}$)	$54,0 \pm 1,1$	$55,4 \pm 0,3$
Rendement global d'hydrolyse (%)	90	77
Rendement spécifique d'hydrolyse (%)	94	83
Rendement spécifique (%) sans 3-CQA	105	98
Hydrolyse réalisée avec AnFaeB à 50°C	Tourteau Industriel de tournesol	Extrait de tourteau non-industriel de tournesol
DACT à $t = 0$ min ($\mu\text{mol EACa/g MSD}$)	$59,9 \pm 1,2$	$66,6 \pm 0,4$
Teneur initiale en DACT dans le tourteau ($\mu\text{mol EACa/g MSD}$)	$57,4 \pm 1,5$	$71,7 \pm 0,5$
Teneur maximale en acide caféique après hydrolyse ($\mu\text{mol/g MSD}$)	$59,8 \pm 2,1$	$68,1 \pm 1,7$
Rendement global d'hydrolyse (%)	100	95
Rendement spécifique d'hydrolyse (%)	104	102

Tableau 27 : Concentrations en acide caféique, DACT et rendements d'hydrolyse (%) global et spécifique après traitement enzymatique du tourteau industriel et de l'extrait méthanolique de tourteau non-industriel de tournesol avec AnFaeB et ChIE à 50°C.

Concernant l'enzyme AnFaeB, les rendements globaux d'hydrolyse sont de 100% pour le tourteau industriel et 95% pour l'extrait de tourteau non-industriel, alors que les rendements spécifiques sont légèrement supérieurs à 100% pour les deux substrats.

Pour l'enzyme ChIE, en revanche, le rendement d'hydrolyse spécifique sur tourteau industriel (94%) est supérieur à celui sur l'extrait de tourteau non-industriel (83%). Cette différence peut être attribuée, en première analyse, à une teneur en acide 3-caféoylquinique (3-CQA) plus

importante dans l'extrait de tourteau non-industriel ($8,9 \pm 0,4 \mu\text{mol EACa/g MSD}$) que dans le tourteau industriel ($6,1 \pm 0,3 \mu\text{mol EACa/g MSD}$), ce composé n'étant pas hydrolysé par ChIE. Par ailleurs, si l'on ne tient pas compte du 3-CQA, c'est-à-dire que le calcul est basé uniquement sur les composés hydrolysables présents dans le milieu à $t = 0 \text{ min}$, des rendements d'hydrolyse proches de 100% sont obtenus dans les deux cas.

3.4. HYDROLYSE ENZYMATIQUE DU TOURTEAU DE COLZA NON-INDUSTRIEL OU DE SON EXTRAIT METHANOLIQUE SEC AVEC ANFAEA

Les conditions optimales d'hydrolyse du tourteau industriel de colza (pH, température et concentration en enzyme) avec AnFaeA ont été déterminées dans l'étude réalisée par Odinet *et al.* (2017). Ces conditions ont été directement testées sur le tourteau de colza non-industriel et sur son extrait méthanolique sec correspondant.

3.4.1. Hydrolyse enzymatique sur le tourteau

L'évolution des teneurs en sinapine, acide sinapique et DAST (Dérivés d'acide sinapique totaux) durant l'hydrolyse enzymatique du tourteau non-industriel de colza avec AnFaeA (39 nkat/g de tourteau, 55°C, pH 5,5) peut être observée sur la Figure 48-A. On pourra remarquer premièrement que l'hydrolyse n'est pas totalement achevée après 240 min de traitement, la teneur en acide sinapique n'ayant pas atteint un plateau. Nous avons néanmoins considéré que sa teneur à $t=240 \text{ min}$, soit $41,3 \pm 0,3 \mu\text{mol/g MSD}$, était suffisamment proche de la valeur maximale¹ pour être prise en compte dans les calculs de rendement d'hydrolyse abordés plus loin. Deuxièmement, la quasi-totalité de la sinapine initialement présente dans le milieu réactionnel ($31,7 \pm 0,6 \mu\text{mol EAS/g MSD}$) ainsi que d'autres mono-esters d'acide sinapique de faible masse moléculaire sont hydrolysés après 240 min d'incubation. En revanche, certains esters d'acide sinapique et de kaempférol ainsi que des di- ou tri- sinapoyl gentibiosides ne sont pas hydrolysés par l'enzyme comme l'indiquent les chromatogrammes obtenus à $t = 0 \text{ min}$ et $t = 240 \text{ min}$ (Figure 49-A).

¹ A l'aide du logiciel CurveExpert 1.3, nous avons lissé la courbe de teneur en acide sinapique libéré en fonction du temps avec un modèle de type "Saturation growth" : $y=ax/(b+x)$ ($r=0,99815$) et établi à $42,54 \mu\text{mol/g MSD}$ la valeur maximale au plateau. La teneur en acide sinapique à $t=240 \text{ min}$ représente donc 97,1% de cette valeur (calculs non détaillés dans ce manuscrit).

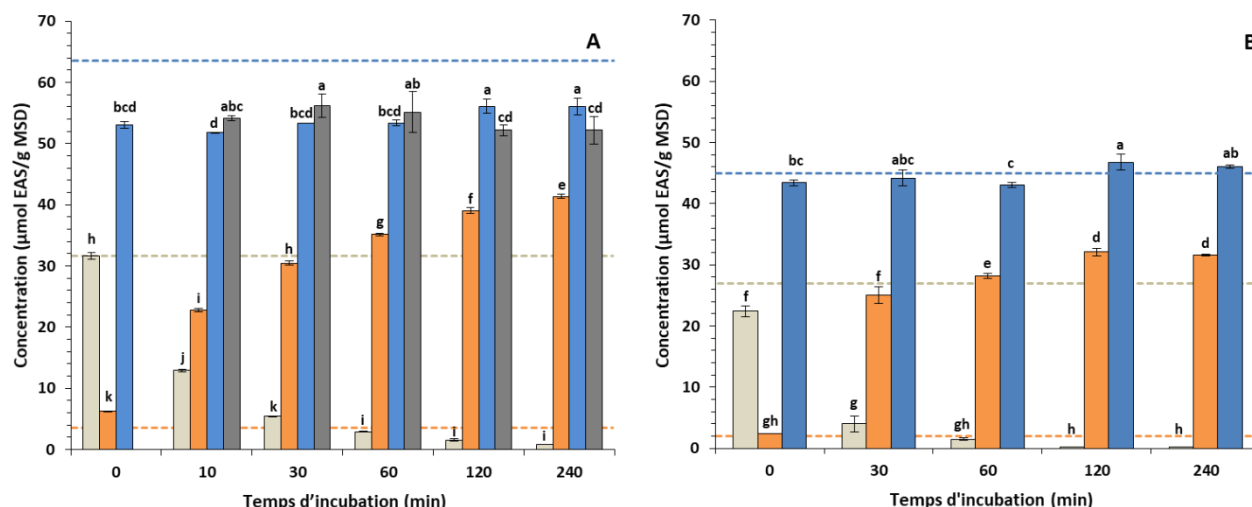


Figure 48 : Hydrolyse des tourteaux de colza non-industriel (A) et industriel (B) avec 39 nkat de AnFaeA/g de tourteau à 55°C et pH 5,5. Evolution au cours du temps des teneurs en sinapine (□), acide sinapique (■) et DAST [avec Enzyme (■), contrôle (■)]. Les lignes en pointillés représentent les teneurs initiales de sinapine (■), acide sinapique (■) et DAST (■) dans les tourteaux. Les valeurs sont des moyennes \pm ET (n=2). Les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, $p \geq 0,05$.

Ces résultats confirment ceux obtenus lors de l'étude réalisée par Odinet *et al.* (2017) dans laquelle la difficulté de l'enzyme AnFaeA à hydrolyser ce type de composé a pu être mise en évidence. Par ailleurs, la teneur en DAST des échantillons au cours de l'incubation s'avère 16% inférieure par rapport à la valeur initialement présente dans le tourteau (Tableau 26). Cette baisse inattendue en DAST peut également être observée sur les témoins sans enzyme (Figure 48-A, barre gris foncé). A nouveau, l'explication probable de cette perte en DAST peut être l'activation d'enzymes endogènes, tels que des PPO, présentes dans le tourteau et capables de dégrader les composés phénoliques. Un élément en faveur de cette hypothèse est l'absence de perte en acide sinapique ou en sinapine lors de l'hydrolyse enzymatique du tourteau industriel de colza réalisée par Odinet *et al.* (2017).

Les teneurs en DAST n'ayant pas été déterminées dans cette étude, nous nous sommes procurés ce tourteau industriel auprès des auteurs de l'étude (Odinot *et al.*, 2017) et l'avons soumis à l'action de l'enzyme AnFaeA dans les mêmes conditions d'hydrolyse que précédemment (55°C, pH 5,5, AnFaeA : 39 nkat/g de tourteau).

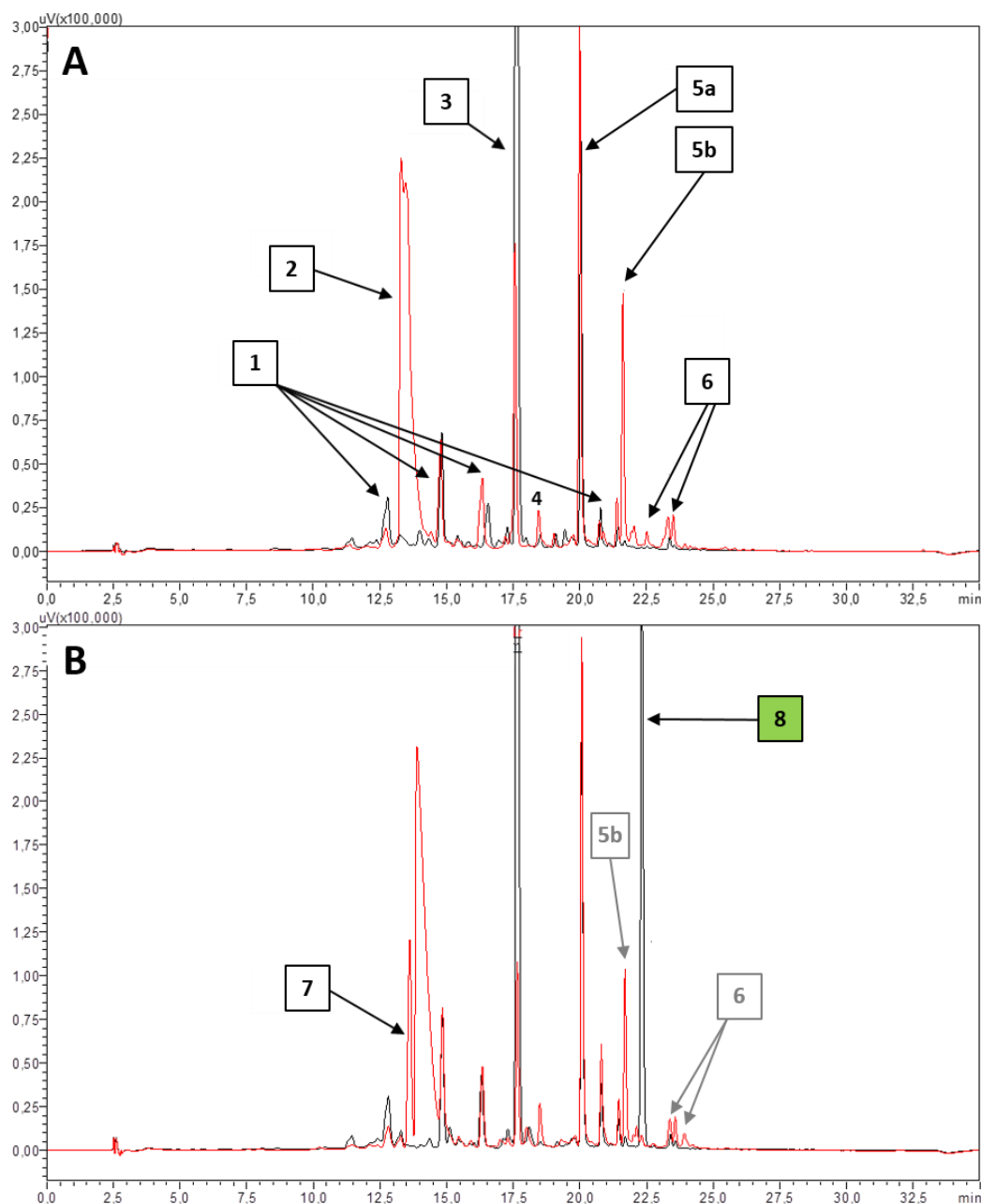


Figure 49 : Chromatogrammes obtenus après hydrolyse enzymatique du tourteau non-industriel de colza (A) et de son extrait méthanolique sec correspondant (B) à $t = 0$ min (rouge) et à $t = 240$ min (noir) à 323 nm. (1) dérivés sinapoyl-Kaempférol, (2) sinapine, (3) acide *trans*-sinapique, (4) acide *cis*-sinapique, (5a) isomère de di-sinapoyl gentiobioside, (5b) isomère de di-sinapoyl glucopyranoside, (6) dérivés tri-sinapoyl gentiobioside, (7) sinapoyl glucopyranoside et (8) isomère de di-sinapoyl glucopyranoside néoformé (structure présumée).

Les résultats sont présentés sur la Figure 48-B. La teneur en DAST, stable au cours du temps et peu différente de la valeur initiale dans le tourteau, montre clairement qu'il n'y a pas eu de

dégradation des composés phénoliques (Tableau 26 et Figure 48-B, ligne pointillé bleu) pendant les phases de pré-incubation puis d'hydrolyse.

Ce résultat permet de valider l'hypothèse que le traitement thermique subi par le tourteau industriel de colza conduit à une désactivation des enzymes endogènes qu'il renferme même si, dans le même temps, il est responsable d'une baisse de 30% de la teneur en DAST (Tableau 26).

3.4.2. Hydrolyse enzymatique sur extrait

De même que pour le tournesol, l'hydrolyse enzymatique a également été réalisée sur l'extrait méthanolique sec du tourteau non-industriel de colza. Nous avons reporté sur la Figure 50-A l'évolution au cours du temps des concentrations en sinapine, acide sinapique et DAST dans l'extrait traité avec AnFaeA (39 nkat/g de tourteau, 55°C, pH 5,5).

Premièrement, et de façon inattendue, il peut être constaté (i) une teneur maximale en acide sinapique ($32,3 \pm 0,4 \mu\text{mol/g MSD}$) inférieure à celle obtenue lors de l'hydrolyse du tourteau non-industriel correspondant ($41,3 \pm 0,3 \mu\text{mol/g MSD}$) et (ii) la formation concomitante d'un nouveau composé phénolique (Figure 50-A, barre verte) dont l'apparition peut également être observée sur le chromatogramme (pic numéro 8) de la Figure 49-B. D'une part, ce composé a une longueur d'onde maximale d'absorption de 326 nm, ce qui indique qu'il contient une ou plusieurs unité(s) sinapoyle. D'autre part, son temps de rétention de 22,4 min est compris entre celui du composé 5b (isomère de di-sinapoyl glucopyranoside) à 21,6 min et celui du groupe 6 des tri-sinapoyl gentiobioside (autour de 23 min). Or, il ne peut s'agir d'un isomère de tri-sinapoyl glucopyranoside, puisque sa polarité plus faible que celle des tri-sinapoyl gentiobioside (le gentiobioside est un disaccharide alors que le glucose est un monosaccharide), supposerait un temps de rétention au-delà de 23 min. Par conséquent, il est raisonnable de penser qu'il s'agit davantage d'un isomère de di-sinapoyl glucopyranoside (nous attendons les résultats d'analyses de RMN ^1H , RMN ^{13}C , et de masse sur le produit isolé par chromatographie afin d'établir définitivement sa structure). En effet, en tenant compte de la présence significative de glucose et de sinapoyl glucopyranoside dans l'extrait méthanolique sec, le composé néoformé pourrait provenir de la trans-estérification de la sinapine avec les molécules susmentionnées. Il est en revanche peu probable que le composé néoformé provienne de l'estérification de l'acide

sinapique puisque sa concentration atteint un palier et reste stable au cours du temps. Cette hypothèse est d'autant plus vraisemblable que l'activité acyle transférase de l'enzyme AnFaeA a déjà été mentionnée par ailleurs, notamment dans les travaux de Hatzakis and Smonou (2005), Hüttner *et al.* (2017) et Vafiadi *et al.* (2009).

Cependant, les raisons pour lesquelles cette réaction a lieu uniquement lors du traitement enzymatique de l'extrait méthanolique sec restent à élucider, une possibilité étant la meilleure accessibilité de l'enzyme aux différents substrats isolés des matrices cellulaires et solubilisés dans le tampon.

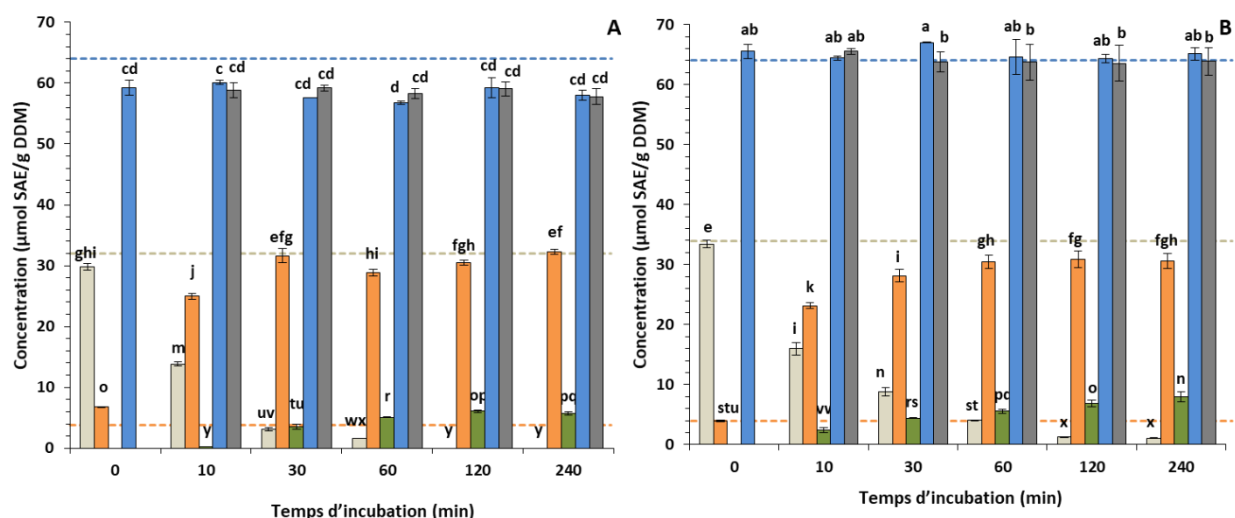


Figure 50 : Hydrolyse de l'extrait méthanolique de tourteau de colza non-industriel avec 39 nkat de AnFaeA /g de tourteau à 55°C (A) et 37°C (B) et pH 5,5. Evolution au cours du temps des teneurs en sinapine (□), acide sinapique (■), nouveau composé phénolique (■) et DAST [avec Enzyme (■), contrôle (■)]. Les lignes en pointillés représentent les teneurs initiales en sinapine (---), acide sinapique (---) et DAST (---) dans l'extrait. Les valeurs sont des moyennes \pm ET (n=2). Les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, $p \geq 0,05$.

Deuxièmement, la teneur en DAST au cours de l'hydrolyse s'avère significativement plus élevée dans l'extrait méthanolique traité ($59,2 \pm 2,3 \mu\text{mol EAS/g MSD}$) que dans le tourteau non-industriel ($53,1 \pm 1,0 \mu\text{mol EAS/g MDS}$), mais légèrement inférieure de 8% à la valeur initiale dans le tourteau non-industriel ($64,2 \pm 1,2 \mu\text{mol EAS/g MSD}$). Cette faible perte a pu être attribuée à l'effet de la température puisque la cinétique d'hydrolyse de l'extrait à 37°C a montré que la teneur en DAST était stable au cours du temps ($65,6 \pm 2,3 \mu\text{mol/g MSD}$) et équivalente à celle du

tourteau initial (Tableau 26 et Figure 50-B ligne pointillé bleu). Ces résultats démontrent donc l'impact négatif d'une température de 55°C sur la préservation des composés phénoliques lors de l'hydrolyse de l'extrait.

Troisièmement, d'un point de vue cinétique, la sinapine est hydrolysée plus lentement à 37°C qu'à 55°C. Sa conversion est complète après 120 min d'incubation à 55°C, alors que 3% de sinapine sont encore présents dans le milieu après 240 min à 37°C. Par ailleurs, la formation d'acide sinapique est plus lente à 37°C, avec une concentration maximale atteinte au bout de 60 min, contre 30 min à 55°C. Enfin, on pourra noter qu'en fin de traitement (240 min) la teneur en composé néoformé (présupposé isomère de di-sinapoyl glucopyranoside) est significativement plus importante à 37°C ($8,0 \pm 0,8 \mu\text{mol EAS/g MSD}$) qu'à 55°C ($5,7 \pm 0,3 \mu\text{mol EAS/g MSD}$), ce qui pourrait indiquer que l'activité acyle transférase est favorisée à basse température au détriment de l'activité d'hydrolyse.

Finalement, les rendements d'hydrolyse (ou rendement en acide sinapique) ont été calculés pour chaque expérience et reportés dans le Tableau 28. Comme pour le tournesol (**voir section 3.3.2**), nous avons déterminé un « **rendement global** » à partir des teneurs initiales en DAST avant traitement, et un « **rendement spécifique** » d'hydrolyse à partir des teneurs en DAST après pré-incubation et avant ajout de l'enzyme ($t=0$).

Dans le cas des tourteaux, le rendement global d'hydrolyse du tourteau industriel (71%) est supérieur à celui du tourteau non-industriel (64%) alors que les rendements spécifiques sont respectivement de 69% et 78%. Les différences au niveau des rendements globaux s'expliquent par l'absence de dégradation des composés phénoliques dans le tourteau industriel lors de l'étape de pré-incubation (teneur en DAST stable), alors que l'inverse se produit dans le cas du tourteau non-industriel. En revanche, la raison pour laquelle les rendements globaux et spécifiques sont du même ordre de grandeur dans le cas du tourteau industriel reste à déterminer. Enfin, on pourra remarquer des rendements d'hydrolyse (spécifiques ou globaux), nettement plus faibles pour les extraits méthanolique secs en raison des réactions de transestérification évoquées plus haut.

Pour conclure, les résultats exposés dans cette partie montrent que l'hydrolyse enzymatique appliquée au tourteau non-industriel de colza permet la plus importante production d'acide sinapique, malgré une perte conséquente en DAST lors de l'étape de pré-incubation. A l'inverse, si les pertes en DAST sont moins importantes lors du traitement de l'extrait, l'existence de réactions secondaires de transfert d'acyle limitent considérablement les teneurs finales en acide sinapique.

	Tourteaux de colza (hydrolyse à 55°C)		Extrait de tourteau de colza non-industriel	
	Non-industriel	Industriel	Hydrolyse à 55°C	Hydrolyse à 37°C
Teneur en DAST à t = 0 (μmol EAS/g MSD)	53,1 ± 1,0 ^c	46,0 ± 0,3 ^d	59,2 ± 2,3 ^b	65,6 ± 2,3 ^a
Teneur initiale en DAST (μmol EACa/g MSD)	64,2 ± 1,2 ^a	44,8 ± 0,2 ^g	64,2 ± 1,2 ^a	64,2 ± 1,2 ^a
Acide sinapique libéré après 240 min d'incubation (μmol/g MSD)	41,3 ± 0,3 ^e	31,6 ± 0,1 ^f	32,3 ± 0,4 ^f	30,6 ± 1,2 ^f
Rendement global d'hydrolyse (%)	64,3	70,5	50,3	47,7
Rendement spécifique d'hydrolyse (%)	77,7	68,6	54,6	46,6

Tableau 28 : Concentration en acide sinapique, DAST et rendements d'hydrolyse (%) après hydrolyse enzymatique des tourteaux industriel et non-industriel de colza et de l'extrait méthanolique sec du tourteau non-industriel de colza avec AnFaA à 55°C et 37°C. Les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, $p \geq 0,05$.

3.5. CONCLUSIONS

Dans cette partie, nous avons étudié l'aptitude de trois cinnamoyl estérases, AnFaeA, AnFaeB et ChIE, à hydrolyser les esters d'acides phénoliques présents dans des tourteaux de colza et de tournesol et leurs extraits méthanoliques correspondants. L'hydrolyse des tourteaux non-industriels, c'est-à-dire n'ayant pas subi de traitement thermique, a mis en évidence la présence d'enzymes endogènes, activées dans les conditions d'hydrolyse et à l'origine d'une perte significative en composés phénoliques. Cette dégradation est plus particulièrement importante dans le cas du tourteau de tournesol, pour lequel l'existence de polyphénol oxydase est déjà connue. Si les traitements thermiques appliqués aux tourteaux industriels permettent de désactiver ces enzymes endogènes et de s'affranchir des phénomènes de dégradation cités précédemment, ils ont l'inconvénient d'entraîner également des pertes non négligeables en

composés phénoliques. De ce fait, l'application de traitements enzymatique aux extraits méthanoliques (supposés exempts d'activité enzymatique de dégradation) de tourteaux non-industriels nous a semblé être une solution intéressante pour contourner ces problèmes. Si cela s'est avéré payant dans le cas du tournesol, pour le colza en revanche, la formation d'un produit secondaire (que nous supposons être un di-sinapoyle glucopyranoside en attendant confirmation), réduit le rendement en acide sinapique et donc l'intérêt de cette voie. Finalement, le meilleur compromis entre rendement global et quantité d'acide phénolique produit dépend du type de matière première (colza ou tournesol) et du type de substrat (tourteau industriel/non-industriel, ou extrait). Ainsi, pour le colza il sera préférable de réaliser ces traitements sur des tourteaux industriels alors que dans le cas du tournesol l'extrait de tourteau non-industriel sera le plus approprié. Notons enfin que cette étude aura également contribué à approfondir les connaissances sur la spécificité d'action des différentes enzymes vis-a-vis des esters d'acides sinapique et caféique.

Après nous être intéressés à la production d'acides sinapique et caféique par voie enzymatique, nous avons poursuivi notre étude par l'élaboration de nouveaux phénolipides à partir de ces acides phénoliques puis à l'évaluation de leurs capacités antioxydantes en milieux émulsifié et homogène. Nous y avons consacré le dernier chapitre de ce manuscrit.

PARTIE 4. SYNTHÈSE DES MONO- ET DI-ESTERS D'ACIDES PHÉNOLIQUES ET ÉVALUATION DE LEURS CAPACITÉS ANTIOXYDANTES EN MILIEU HÉTÉROGÈNE ET HOMOGÈNE.

Nous avons vu dans la partie bibliographique que les propriétés antioxydantes et antiradicalaires des acides phénoliques étaient dues à la présence d'un ou plusieurs groupements hydroxyle sur leur cycle aromatique et à leur capacité à céder un électron ou un atome d'hydrogène à des espèces radicalaires. À côté de leur réactivité intrinsèque, leur polarité ainsi que le milieu dans lesquels ils se trouvent jouent un rôle primordial sur leur capacité antioxydante. Dans les milieux lipidiques dispersés contenant des interfaces ou des membranes, comme les émulsions ou les suspensions de liposomes, la capacité antioxydante des acides phénoliques peut être améliorée en modifiant leur balance hydrophile/hydrophobe par lipophilisation. À ce jour, la modification la plus courante consiste en l'estérification de la fonction carboxylique de l'acide phénolique avec des alcools aliphatiques de longueur de chaîne alkyle variable. Les esters résultants, sous forme de série d'analogues structuraux ne différant que par la longueur de la chaîne alkyle, sont nommés sous le vocable « phénolipides ». Par ailleurs, en milieux lipidiques dispersés, l'évolution de la capacité antioxydante des phénolipides en fonction de leur hydrophobie se caractérise par un effet de seuil, c'est-à-dire qu'il existe une longueur de chaîne alkyle optimale (Longueur de chaîne critique - LCC) pour laquelle une amélioration importante de l'activité est observée. Autrement dit, si la chaîne lipidique est trop courte ou trop grande, l'activité de la molécule peut se révéler bien inférieure à ce qui peut être espéré. De ce fait, la recherche de la longueur de chaîne carbonée optimale est au cœur de la stratégie de lipophilisation des acides phénoliques.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la synthèse de mono- et di-esters d'acide sinapique et caféique avec des α,ω -diols à chaîne alkyle contenant 2 à 12 atomes de carbone. À notre connaissance, c'est la première fois que ce type de mono-ester, c'est-à-dire avec une fonction hydroxyle en bout de chaîne alkyle, est synthétisé. Par contre, il existe dans la nature des di-esters d'acides phénoliques, tels que les isomères de di-sinapoylglucopyranoside de colza ou les acides di-caféoylquiniques de tournesol. Il s'agit néanmoins de composés de polarité élevée

et de structure définie, dont l'isolement après extraction et purification, reste fastidieux et onéreux compte tenu de leur faible concentration dans les matières premières végétales. La double estérification des acides caféique et sinapique avec des α,ω -diols à chaîne alkyle variable représente donc une voie d'accès à des di-esters phénoliques dont la structure, la réactivité et la polarité peuvent être ajustées.

Il est attendu de ces modifications structurales un impact sur les propriétés amphiphiles et antioxydantes des mono- et di-esters d'acide sinapique et caféique, notamment dans les systèmes lipidiques dispersés ou les interactions avec les interfaces (huile/eau) ou les membranes sont essentielles.

L'objectif de ce travail n'étant pas le développement d'un procédé optimisé mais la synthèse de deux séries de phénolipides en quantité suffisante pour en évaluer les propriétés antioxydantes, les synthèses ont été réalisées avec les acides sinapique et caféique commerciaux qui sont facilement accessibles et peu onéreux. L'idée sous-jacente est d'évaluer la faisabilité de ces synthèses avant d'envisager leur application aux fractions phénoliques des tourteaux de colza et de tournesol. Dans un premier temps, la synthèse des mono-esters des deux acides phénoliques a été réalisée en milieu fondu en utilisant les différents diols comme réactifs et solvants. Puis, après purification, des différents mono-esters ont subis une deuxième estérification, par réaction de Mitsunobu, pour aboutir aux di-esters correspondants.

4.1. MONO-ESTERIFICATIONS DES ACIDES PHENOLIQUES EN MILIEU FONDU

La synthèse des mono-esters a été envisagée par l'estérification des acides phénoliques avec différents α,ω -diols, selon les conditions décrites sur la Figure 51. La réaction a été réalisée à 90°C avec 3 % (v/v par rapport du diol) d'acide sulfurique pur et en présence de tamis moléculaire 4Å pour absorber l'eau générée pendant la réaction et éviter l'hydrolyse des esters formés. Afin de limiter la formation des di-esters, les α,ω -diols ont été introduits en très large excès par rapport à l'acide phénolique (rapport molaire de 5 à 50 pour 1). Dans ces conditions, nous avons observé l'apparition lente du mono-ester et l'absence de formation du di-ester.

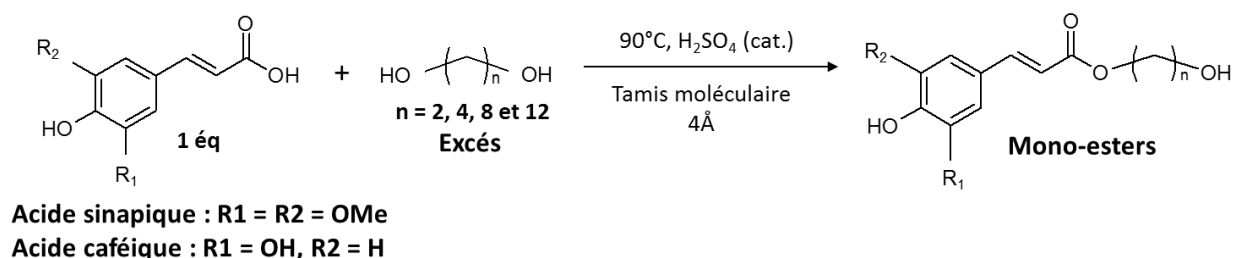


Figure 51 : Schéma réactionnel de mono-estérification des acides phénoliques en milieu fondu.

Afin d'avoir une idée approximative de la durée de la réaction, un suivi au cours du temps de la conversion de l'acide phénolique et de l'apparition du mono-ester correspondant a été réalisé par analyse HPLC des bruts réactionnels.

Les cinétiques d'estérification avec l'éthylène glycol, le 1,4-butanediol, le 1,8-octanediol, et le 1,12-dodécanediol sont présentées sur la Figure 52 pour l'acide sinapique et sur la Figure 53 pour l'acide caféique. Chaque cinétique ayant fait l'objet d'un seul essai, les résultats sont donnés à titre indicatif et doivent être considérés comme tels.

Mono-estérification de l'acide sinapique

Globalement, le temps correspondant à la conversion maximale de l'acide sinapique (97-99%) semble augmenter avec la longueur de la chaîne alkyle du diol : de l'ordre de 60 min pour l'éthylène glycol, et le butanediol et 90 min pour l'octanediol et le dodécanediol. Par ailleurs, à l'exception du mono-ester d'éthylène glycol, la quantité molaire maximale de mono-ester produite (basée sur l'aire du pic correspondant en HPLC) est inférieure à la quantité molaire initiale d'acide sinapique et tout particulièrement dans le cas du mono-ester à 12 carbones (1,12-dodécanediol). Le rendement molaire apparent en mono-ester de longueur de chaîne comprise entre 2 et 8 carbones est compris entre 93% et 100% alors que celui du mono-ester de 1,12-dodécanediol n'est que de 68%.

De notre point de vue, la raison de cette baisse apparente de rendement est vraisemblablement liée la diminution de la solubilité des mono-esters dans le solvant d'élution chromatographique. En effet, le solvant utilisé pendant l'étape d'analyse étant un gradient polaire constitué d'eau et

de méthanol, il est possible qu'une fraction de mono-ester ne soit pas soluble dans le mélange, et que cette fraction soit d'autant plus importante que la chaîne alkyle du mono-ester est longue. Néanmoins, nous ne pouvons exclure l'existence de phénomènes de dégradation des mono-esters, compte tenu de la température élevée de la réaction (90°C) et de la baisse de leur concentration au cours du temps après avoir atteint un maximum.

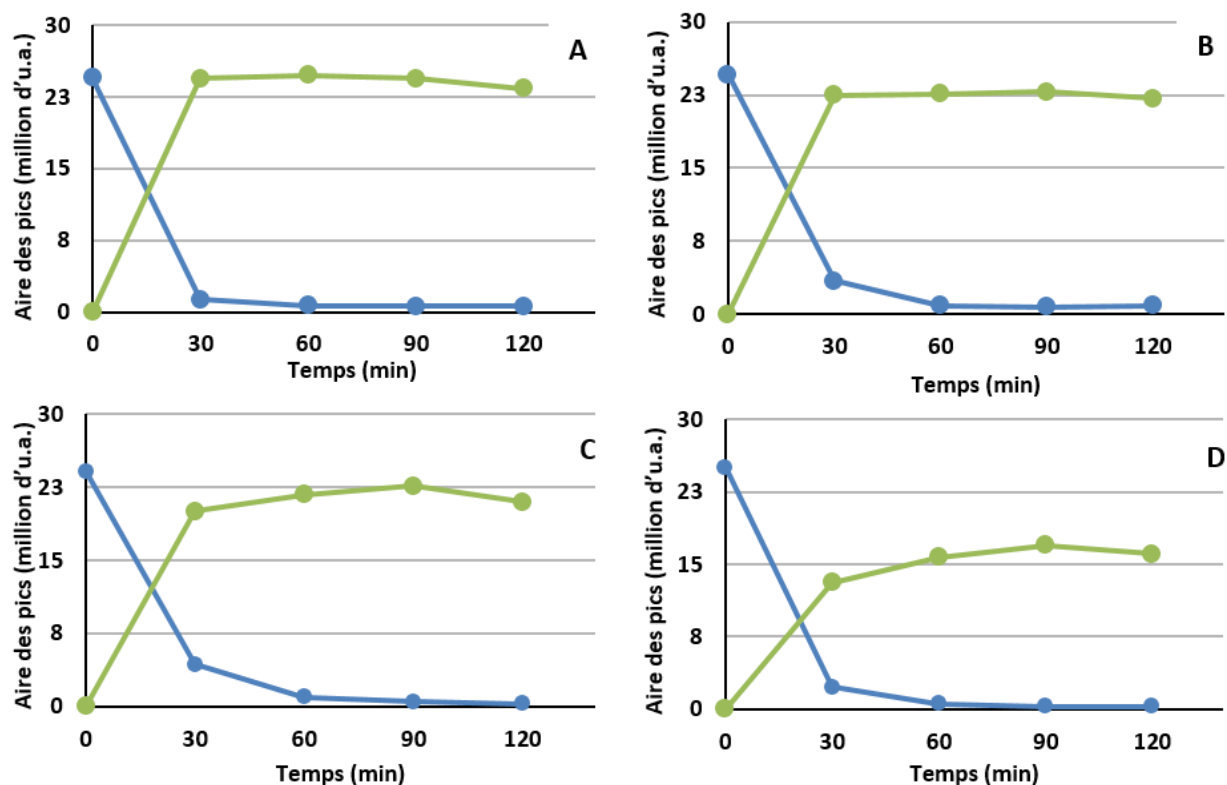


Figure 52 : Cinétiques d'estérification de l'acide sinapique en présence de différents diols par HPLC-UV à 328 nm : éthylène glycol (A), 1,4-butanediol (B), 1,8-octanediol (C) et 1,12-dodécanediol (D). (—●—) Acide sinapique et (—●—) mono-ester.

Mono-estérification de l'acide caféique

Contrairement aux résultats précédents, et quel que soit le diol, la conversion totale de l'acide caféique et la formation des mono-esters semble plus rapide puisqu'elle intervient en 60 minutes environ (Figure 53). En revanche, les rendements en mono-ester sont globalement plus faibles et compris entre 74% et 83%. A longueur de chaîne alkyle équivalente, les mono-esters d'acide caféique étant plus polaires que ceux de l'acide sinapique (confirmé par des temps de rétention plus courts en HPLC) les problèmes de solubilité dans le solvant d'élution chromatographique ne

peuvent donc être évoqués comme la cause principale de ces plus faibles rendements. Il est plus probable, en revanche, qu'ils soient liés à des phénomènes de dégradation de l'acide caféique (et non des mono-esters) dans le milieu réactionnel, ce composé étant connu pour être particulièrement sensible à la température et à l'oxydation en raison de la présence du noyau catéchol dans sa structure.

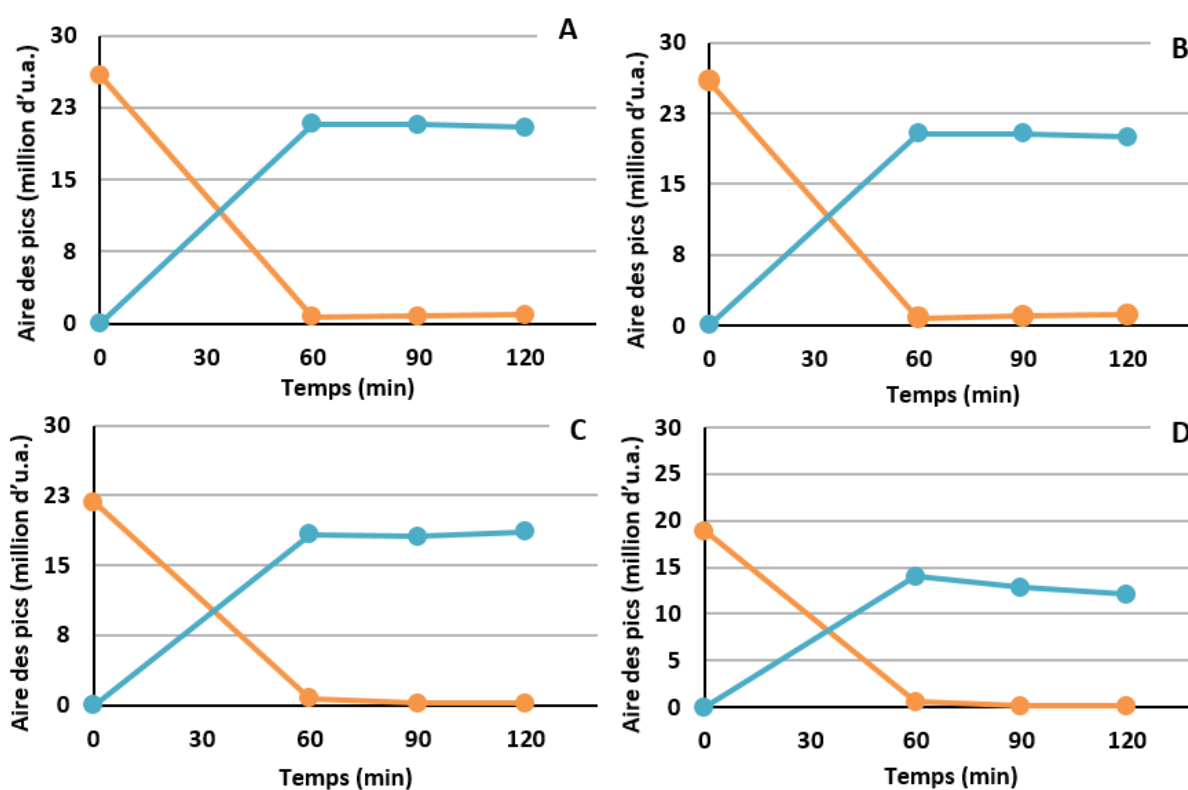


Figure 53 : Cinétiques d'estérification de l'acide caféique en présence de différents diols par HPLC-UV à 328 nm : éthylène glycol (A), 1,4-butanediol (B), 1,8-octanediol (C) et 1,12-dodécanediol (D). (—●—) Acide sinapique et (—●—) mono-ester.

Une fois synthétisés, les différents mono-esters ont été purifiés par chromatographie flash. Comme l'indique la Figure 54, l'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle au-delà de 4 carbones se traduit par une diminution importante des rendements après purification, et plus particulièrement pour les mono-esters d'acide caféique. En effet, dans le cas des mono-esters à courtes chaînes, des extractions liquides-liquide préliminaires ont permis d'éliminer une grande partie des diols initiaux, ce qui a facilité l'étape de purification par chromatographie flash et limité les pertes en mono-esters. En revanche, cette étape de séparation liquide-liquide s'est avérée

inefficace pour les diols à chaînes alkyle plus longues en raison de leur polarité très similaire à celle des mono-esters. La purification par chromatographie flash des bruts réactionnels correspondant s'est alors traduite par des pertes plus importantes en mono-esters.

Finalement, les mono-esters isolés à partir des fractions chromatographiques les plus pures ont été analysés par RMN ^1H et ^{13}C ce qui a permis de confirmer leur structure (**Chapitre « Matériels et Méthodes » section 2.7.1, Tableaux 14 et 15**).

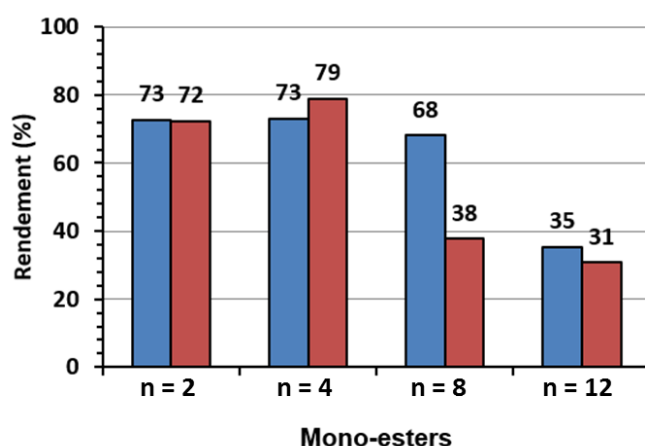


Figure 54 : Rendement après purification des différents mono-esters : (■) acide sinapique et (■) acide caféique.

4.2. DI-ESTERIFICATIONS DES ACIDES PHENOLIQUES EN MILIEU FONDU

La synthèse des di-esters d'acides sinapique et caféique a été réalisée par réaction de Mitsunobu dans les conditions décrites par la Figure 55.

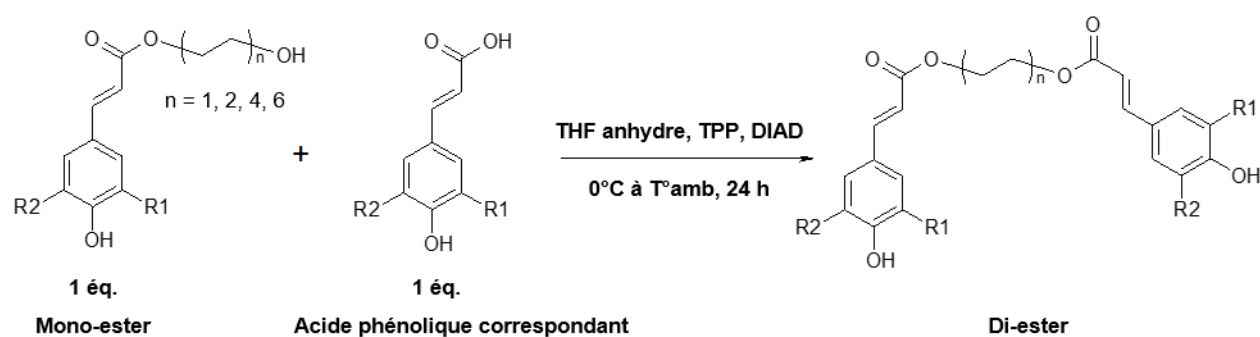


Figure 55 : Schéma réactionnel des réactions de di-estérification des acides phénoliques via la réaction de Mitsunobu.

Après 24 h de réaction (pas de suivi cinétique), les différents di-esters ont été pré-purifiés par extraction liquide-liquide, puis isolés par chromatographie flash. Les rendements en di-ester après purification sont reportés sur la Figure 56.

Concernant les di-esters d'acide sinapique, les rendements après purification oscillent entre 32% et 43%, sans qu'il y ait de tendance en rapport avec la longueur de la chaîne alkyle. En revanche, il peut être observé une augmentation linéaire du rendement avec le nombre d'atomes de carbone de la chaîne alkyle, de 16% à 49%, pour les di-esters d'acide caféique.

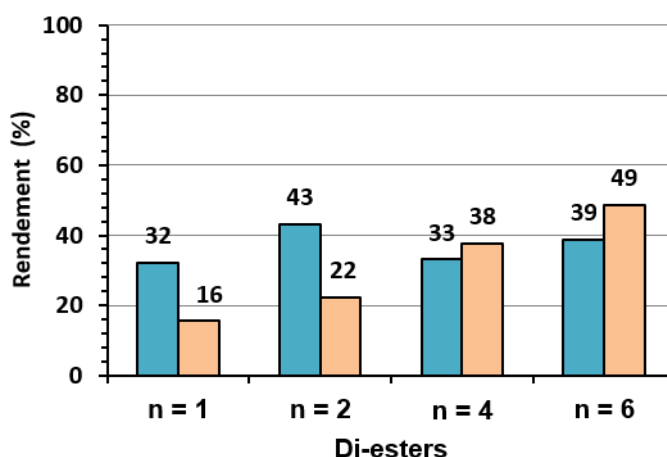


Figure 56 : Rendement après purification des différents di-esters d'acide sinapique (■) et d'acide caféique (■).

Si en l'état actuel nous n'avons pas d'explications précises à ces faibles rendements, nous pouvons néanmoins avancer quelques éléments de réflexion utiles à leur compréhension. Il faut savoir tout d'abord que dans la réaction de Mitsunobu la basicité de l'acide phénolique sous forme carboxylate joue un rôle primordial dans sa réactivité. En effet, comme l'ont montré Batovska *et al.* (2005), plus l'ion carboxylate est basique et moins il est réactif vis-à-vis de la fonction hydroxyle de l'alcool. La forme carboxylate de l'acide caféique ($pK_a = 4,83$) étant plus basique que celle de l'acide sinapique ($pK_a = 4,25$), elle est donc moins réactive et la formation du di-ester est donc défavorisée. Par ailleurs, ces mêmes auteurs ont clairement montré l'effet négatif de l'encombrement stérique de l'hydroxyle de l'alcool. On peut donc penser que, dans le cas des mono-esters d'acide caféique, l'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle permet

d'éloigner l'hydroxyle terminal du noyau phénolique et de réduire progressivement son encombrement stérique. Ceci pourrait expliquer l'augmentation linéaire du rendement des di-esters d'acide caféique avec l'allongement de leur chaîne aliphatique.

A côté de ces aspects mécanistiques, il est important de garder à l'esprit que ces synthèses ont fait l'objet d'une répétition unique et que la durée de réaction a été limitée à 24h. Il est donc possible que la conversion des mono-ester n'ait pas été complète. Enfin, l'existence de réactions secondaires inhérentes à cette synthèse et les pertes éventuelles de produits lors des étapes de purifications ont vraisemblablement contribué également à ces rendements modestes. Finalement, la structure de chaque di-esters a été confirmée par RMN ^1H et ^{13}C (**Chapitre « Matériels et Méthodes », section 2.7.2, Tableaux 16 et 17**).

En conclusion, la synthèse par voie chimique des différents esters d'acide sinapique et caféique a été réalisée par différentes voies ce qui nous a permis d'isoler chaque composé à l'état pur en quantités suffisantes (> 100 mg) et de déterminer leur structure. Compte tenu des faibles rendements obtenus, il pourrait être envisagé à la suite de ces travaux (i) soit une optimisation des conditions de synthèse et de purification mises en œuvre dans cette étude, (ii) soit la recherche d'autres voies réactionnelles plus performantes ou davantage en accord avec les principes de chimie verte et durable. Dans ce sens, des réactions (chimio)enzymatiques permettant la formation sélective des mono- ou des di-esters pourraient être avantageuses. Suite aux résultats obtenus en **section 3.4.2**, il serait intéressant d'évaluer la faisabilité de la transestérification de la sinapine (ou du méthyl sinapate) en présence des diols avec l'enzyme AnFaeA et, en cas de succès, d'appliquer directement le procédé aux extraits de tourteaux de colza.

4.3. CAPACITE ANTIOXYDANTE DES DIFFERENTS MONO- ET DI-ESTERS D'ACIDES PHENOLIQUES EN MILIEU EMULSIONNE ET EN MILIEU HOMOGENE.

La lipophilisation est un outil permettant, dans certaines conditions, d'améliorer la capacité antioxydante des acides phénoliques en ajustant leur balance hydrophile/hydrophobe. Dans cette partie de l'étude, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la capacité antioxydante en milieux homogène et hétérogène des différents mono- et di-esters synthétisés dans la partie

précédente. De ce fait, la méthode des Triènes Conjugués Autooxydables - CAT (**Chap.1, section 6.1 et Chap.3, section 2.8.1**) a été utilisée pour déterminer la capacité antioxydante des différents esters en milieu émulsionné. Finalement, la capacité antiradicalaire en milieu homogène des différentes molécules a été déterminée par la méthode de DPPH• (**Chap.1, section 6.1 et Chap.3, section 2.8.2**). Afin de pouvoir comparer les différents résultats obtenus par les deux méthodes de mesures, les résultats obtenus ont été exprimés en mol d'équivalent Trolox par mole de composé testé (éq. Trolox/mol composé). La comparaison des résultats nous a permis d'établir un classement des différents phénolipides en termes d'efficacité dans les deux milieux considérés.

4.3.1. Capacité antioxydante des mono-esters en émulsion

L'effet de l'allongement de la chaîne alkyle sur la capacité antioxydante en émulsion (test CAT) des acides sinapique et caféique et de leurs mono-esters respectifs peut être observé sur la Figure 57. Nous y avons indiqué également les valeurs correspondant à la sinapine et à l'acide chlorogénique, composés phénoliques majoritaires des tourteaux de colza et de tournesol respectivement. Tout d'abord, il pourra être constaté que la capacité antioxydante de l'acide caféique ($2,44 \pm 0,05$ éq. Trolox/mol) est du même ordre de grandeur que celle de l'acide sinapique ($2,50 \pm 0,13$ éq. Trolox/mol).

Ces résultats sont surprenants au premier abord car l'acide sinapique devrait avoir une capacité antioxydante moins élevée que celle de l'acide caféique qui possède un groupement catéchol constitué d'un noyau aromatique à deux hydroxyles adjacents (dont l'un en position *para*-) connu pour sa réactivité chimique supérieure. En effet, l'ordre de réactivité de ces deux acides hydroxycinnamiques, basé sur l'enthalpie de dissociation (BDE) de la liaison -O-H phénolique exprimée en kcal.mol⁻¹ (* théorique, **expérimentale) est la suivante (Guitard *et al.*, 2016) : Acide caféique (72,1* - 73,6**) > 5-CQA (73,4* - 78,7**) > Acide sinapique (75,4* - 81,2**). Cependant, l'acide caféique est un peu plus soluble dans l'eau à 25°C que l'acide sinapique, respectivement 0,98 g.L⁻¹ et 0,77g.L⁻¹ (Shakeel *et al.*, 2016 ; Mota *et al.*, 2008), ces deux acides phénoliques se trouvant en grande partie sous forme carboxylate à pH 7,2 (pKa de 4,83 pour l'acide caféique et 4,25 pour l'acide sinapique). On peut donc penser que dans le cas de l'acide caféique sa plus

grande réactivité est compensée par une concentration supérieure dans la phase aqueuse continue de l'émulsion plutôt qu'à l'interface huile/eau où se produit l'oxydation lipidique.

Par ailleurs, les capacités antioxydantes de la sinapine ($1,90 \pm 0,03$ éq. Trolox/mol composé) et de l'acide chlorogénique ($2,02 \pm 0,04$ éq. Trolox/mol composé) se sont avérées plus faibles que celles de leur acide phénolique correspondant.

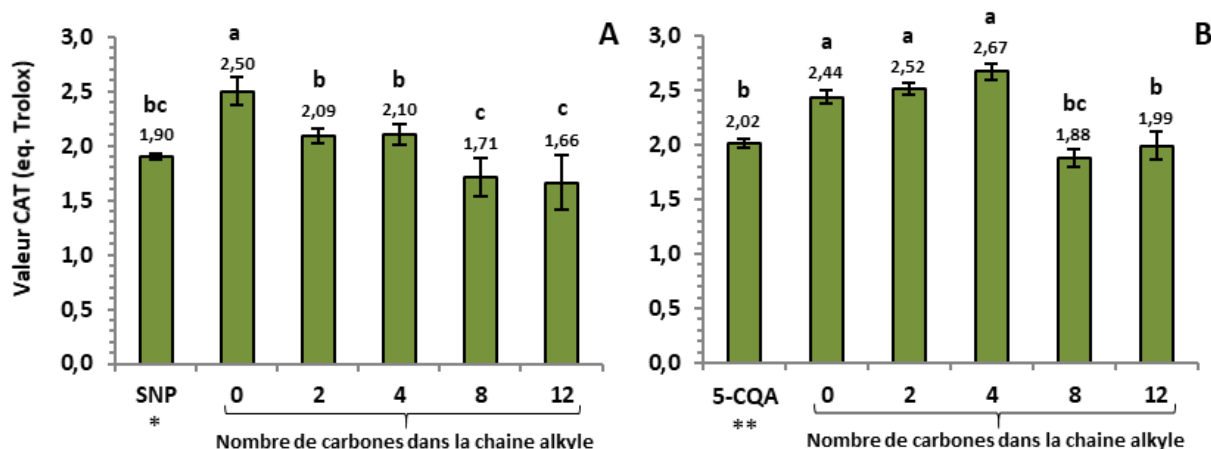


Figure 57 : Valeurs CAT des mono-esters d'acide sinapique (A) et d'acide caféique (B) à chaîne alkyle de 2 à 12 carbones. Note : *SNP = sinapine et **5-CQA = acide chlorogénique. Les valeurs sont des moyennes \pm ET (n=3). Les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, $p \geq 0,05$.

Bien que la sinapine et l'acide chlorogénique partagent le même noyau phénolique que leur acide correspondant (il en est donc attendu une réactivité similaire), ces molécules sont en revanche nettement plus polaires (²Log P: Sinapine : -0,93/acide sinapique : 1,62 ; 5-CQA : 0,17/ acide caféique : 1,67) et leur concentration dans la phase aqueuse par rapport à l'interface est certainement encore plus accentuée.

Par ailleurs, une diminution significative de la capacité antioxydante de l'acide sinapique est observée après estérification avec les différents diols aliphatiques. Cet effet négatif de l'estérification de l'acide sinapique sur la capacité antioxydante semble en contradiction avec la

² Les valeurs de Log P [logarithme du rapport des concentrations d'un composé dans l'octanol et dans l'eau qui rend compte de son caractère hydrophile (valeur faible à négative) ou hydrophobe (valeur positive et élevée)] ont été calculées grâce au logiciel libre ALOGPS 2.1 accessible en ligne sur le site de Virtual Computational Chemistry Laboratory (<http://www.vcclab.org/lab/alogps>)

plupart des études qui mettent en évidence un effet de seuil (ou effet « cut-off ») particulièrement marqué de l'hydrophobie pour les esters d'une même famille de phénolipides.

Deux aspects importants sont néanmoins à prendre en considération dans l'interprétation de ces résultats. Le premier, est la solubilité en phase aqueuse de l'acide de départ avant estérification. Lorsque celle-ci est très élevée, c'est-à-dire de plusieurs grammes ou dizaines de grammes par litre (cas des acides chlorogénique et rosmarinique) l'association d'une chaîne alkyle de longueur croissante à l'acide permet une modulation progressive de l'hydrophobie avec un maximum d'activité antioxydante pour une longueur de chaîne critique (LCC) de 8 à 12 atomes de carbone : la balance hydrophile/hydrophobe de l'ester est optimale et sa concentration à l'interface est maximale. Par conséquent, une réduction drastique de la solubilité en phase aqueuse de l'acide de départ peut se traduire par une diminution de la LCC, voire à une absence de celle-ci lorsque l'hydrophobie des esters est trop importante, y compris pour ceux à courte chaîne alkyle.

Le deuxième aspect a trait au type de molécule obtenu par estérification des acides phénoliques avec les diols aliphatiques. En effet, l'extrémité des chaînes alkyles est un groupement hydroxyle (absent chez les phénolipides synthétisés avec des alcools aliphatiques) qui fait des mono-esters d'acides sinapique des composés à deux têtes polaires.

Bien que cette fonction hydroxyle supplémentaire amène de la polarité, il est possible qu'elle induise des phénomènes d'auto-assemblage à faibles concentrations, notamment par la formation de micelles, susceptibles de diminuer la mobilité des mono-esters et leur transport vers l'interface huile/eau et (hypothèse de l'auto-agrégation).

Concernant l'acide caféique, en revanche, on observe une légère augmentation de la capacité antioxydante avec la longueur de la chaîne alkyle, jusqu'à un maximum correspondant au mono-ester à chaîne carbonnée à quatre atomes de carbone ($2,67 \pm 0,07$ éq. Trolox), puis une chute significative pour les esters à chaîne plus longue. Si les phénomènes d'autoagrégation des mono-esters d'acide caféiques sont également suspectés, ils interviennent vraisemblablement pour des longueurs de chaîne alkyle supérieures, puisque qu'au départ l'acide caféique est plus polaire que l'acide sinapique.

4.3.2. Capacité antioxydante des di-esters en émulsion.

Les différents résultats obtenus par la méthode CAT des di-esters de l'acide sinapique et de l'acide caféique peuvent être observés sur la Figure 58.

Contrairement au mono-esters, un effet de seuil bien marqué peut être observé pour les deux séries de phénolipides, la capacité antioxydante maximale étant atteinte pour une longueur de chaîne critique de quatre atomes de carbone pour les di-esters d'acide caféique, et entre deux et huit pour les di-esters d'acide sinapique.

On pourra remarquer néanmoins que, malgré la présence de deux cycles phénoliques dans la structure de chaque di-ester, aucun d'eux n'a une capacité antioxydante deux fois supérieure à celle de l'acide phénolique correspondant, y compris pour le di-ester à longueur de chaîne critique. En effet, pour la série des di-esters de l'acide sinapique, la valeur maximale est de $3,49 \pm 0,29$ éq. Trolox/mol (acide sinapique : $2,50 \pm 0,13$ éq. Trolox/mol) et $4,19 \pm 0,05$ éq. Trolox/mol pour la série des di-esters de l'acide caféique (acide caféique : $2,44 \pm 0,05$ éq. Trolox/mol). De notre point de vue, cette différence significative pourrait provenir de l'auto-organisation des di-esters au travers d'interactions inter- et intramoléculaires de type « π -stacking » (recouvrement des orbitales p entre deux cycles aromatiques) entre les cycles phénoliques des di-esters. Ce phénomène serait d'autant plus important avec les courtes chaînes alkyles que les deux cycles phénoliques sont plus proches l'un de l'autre. Normalement, plus les interactions de type « π -stacking » sont importantes, plus la capacité à piéger les électrons libres est améliorée du fait que l'énergie de dissociation de la liaison $-OH$ de la fonction hydroxyle du cycle phénolique est diminuée par stabilisation du radical phénoxy (Laguerre *et al.*, 2010).

Cependant, cet auto-assemblage entraînerait aussi une perte de la mobilité de la molécule vers l'interphase huile/eau (hypothèse de la mobilité réduite) et par conséquent une légère diminution de la capacité antioxydante attendue. Finalement, cette diminution serait d'autant plus importante avec les di-esters contenant les chaînes alkyles plus longues pour deux raisons : (i) les interactions de type « π -stacking » seraient plus difficile entre les cycles phénoliques à cause de la distance qui les sépare et (ii) la mobilité serait aussi réduite à cause d'une augmentation de la lipophilie défavorable aux interactions avec l'interface.

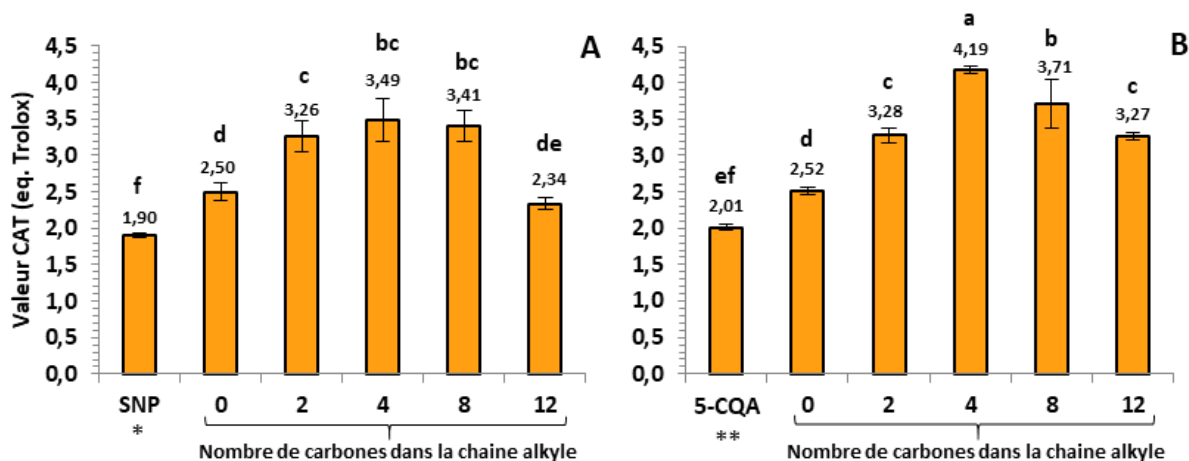


Figure 58 : Valeurs CAT des di-esters d'acide sinapique (A) et d'acide caféique (B) à chaîne alkyle de 2 à 12 carbones. Note : *SNP = sinapine et **5-CQA = acide chlorogénique. Les valeurs sont des moyennes \pm ET (n=3). Les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, $p \geq 0,05$.

Après avoir évalué la capacité antioxydante des mono- et di-esters d'acide sinapique et caféique en émulsion, nous nous sommes intéressés à leur activité antiradicalaire en milieu homogène déterminée par la méthode DPPH.

4.3.3. Capacité antiradicalaire des mono-esters en milieu homogène.

Les valeurs obtenues par le test de DPPH[•] des mono-esters de l'acide sinapique et de l'acide caféique peuvent être observées sur la Figure 59.

Globalement, pour la série de l'acide sinapique (Figure 59-A), les capacités antiradicalaires de la sinapine ($1,08 \pm 0,08$ eq. Trolox/mol), de l'acide sinapique ($1,03 \pm 0,04$ eq. Trolox/mol) et des mono-esters contenant entre 2 et 8 carbones dans leur chaîne alkyle ($1,04$ - $1,01$ eq. Trolox/mol), ne sont pas significativement différentes les unes des autres. Ces résultats montrent que l'augmentation de l'hydrophobie des mono-esters, au travers de l'insertion d'une chaîne alkyle de longueur variable sur l'acide sinapique, n'amène pas d'amélioration de la capacité à réduire les radicaux DPPH[•].

Cette tendance avait déjà été observée dans les études réalisées par Gaspar *et al.* (2010) et Szydłowska-Czerniak *et al.* (2018). Par contre, une forte diminution de la capacité antiradicalaire

est observée ici pour le mono-ester contenant 12 carbones dans sa chaîne alkyle. Cet effet négatif de la lipophilisation de l'acide sinapique avec le diol contenant 12 carbones pourrait être lié à des problèmes d'encombrement stérique ou solubilité dans le milieu réactionnel.

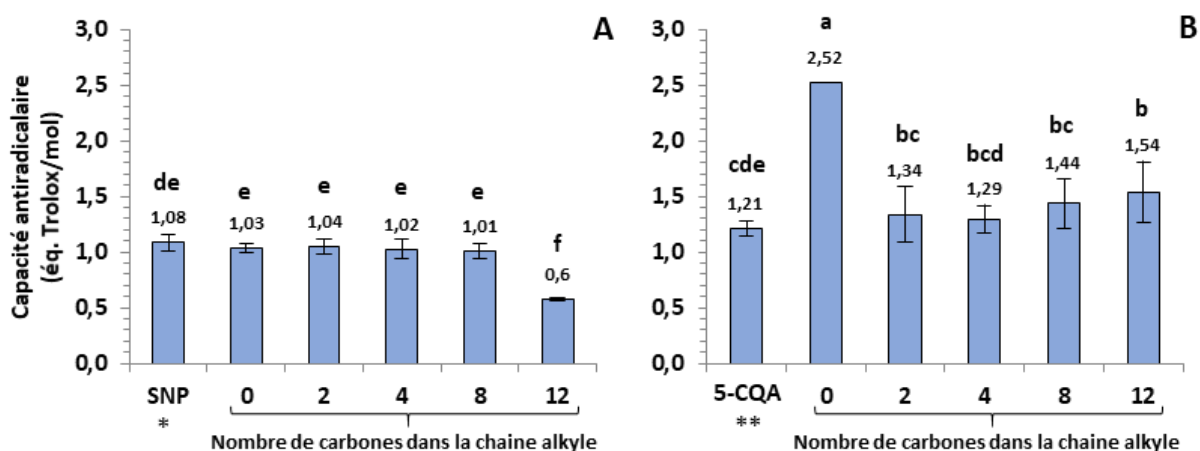


Figure 59 : Capacité antiradicalaire des mono-esters d'acide sinapique (A) et d'acide caféique (B) à chaîne alkyle de 2 à 12 carbones. Note : *SNP = sinapine et **AC = acide chlorogénique. Les valeurs sont des moyennes \pm ET (n=4). Les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, $p \geq 0,05$.

Pour la série de l'acide caféique (Figure 59-B), la capacité antiradicalaire la plus élevée est obtenue pour l'acide de départ ($2,52 \pm 0,00$ éq. Trolox/ mol) alors que l'acide chlorogénique présente la plus faible capacité à réduire les radicaux DPPH• ($1,21 \pm 0,07$ éq. Trolox/mol). L'estérification de l'acide caféique avec les différents diols aliphatiques entraîne une chute drastique de la capacité antiradicalaire et, compte tenu des écart-types associés aux valeurs, l'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle n'a pas d'influence sur la capacité antiradicalaire des différents mono-esters. Cette tendance avait été observée également pour d'autres séries de phénolipides de l'acide caféique, notamment dans l'étude réalisée par Gaspar *et al.* (2009).

Ces résultats sont très intéressants du fait que l'acide caféique ainsi que ses esters possèdent le même noyau catéchol et devrait, théoriquement, avoir aussi les mêmes capacités à piéger des radicaux libres. Néanmoins, le fait que la fonction carboxylique de l'acide caféique soit estérifiée (avec l'acide quinique dans le cas de l'acide chlorogénique ou avec les différents diols aliphatiques) se traduit par une diminution de la BDE (Enthalpie de dissociation) de la liaison –O-

H phénolique et d'une moindre capacité à piéger les radicaux libres par cession d'un hydrogène. Les études réalisées par Sroka and Cisowski (2003) et plus récemment par Cho *et al.* (2016) ont clairement montré que la capacité antiradicalaire de l'acide caféique était supérieure à celle de l'acide chlorogénique. Par ailleurs, l'activité antiradicalaire globale d'une molécule est également liée à sa capacité à former des adduits par couplage radicalaire, notamment au niveau des cycles aromatiques, et générer de nouvelles espèces réactives par phénomène de régénération. De fait, l'estérification peut se traduire par un encombrement stérique qui limite ce phénomène de régénération, comme l'ont montré d'autres auteurs. Dans notre étude, l'acide chlorogénique est l'ester qui possède le groupement le plus encombrant de toute la série des dérivés d'acide caféique étudiée dans cette partie et il est aussi celui qui possède la capacité antiradicalaire la plus faible.

Un autre moyen d'expliquer les résultats obtenus dans cette étude revient à calculer le nombre de radicaux DPPH• réduits par molécule d'antioxydant, nommé aussi stœchiométrie réelle. Cette valeur est calculée de la façon suivante :

$$n = \frac{DPPH}{(EC50 * 2)}$$

Avec « DPPH » la quantité initiale de DPPH• en nmol.

Les valeurs de stœchiométrie réelle du Trolox, de l'acide sinapique, de l'acide caféique et de l'acide chlorogénique sont regroupées dans le Tableau 29.

Composé	Stœchiométrie de base (-OH)	EC ₅₀ (nmol)	Stœchiométrie réelle	Eq. Trolox/mol
Trolox	1	3,02 ± 0,10	3,31 ± 0,08	1
Acide sinapique	1	2,93 ± 0,12	3,41 ± 0,14	0,93 ± 0,03
Acide caféique	2	1,20 ± 0,0	8,3 ± 0,00	2,52 ± 0,00
Acide chlorogénique	2	2,5 ± 0,14	4,01 ± 0,23	1,2 ± 0,1

Tableau 29 : Différents paramètres antiradicalaires des acides phénoliques et du Trolox.

Nous avons comparé, dans le Tableau 29, la stœchiométrie réelle à la stœchiométrie de base, qui correspond au nombre d'hydroxyle(s) libre(s) sur le cycle phénolique de chaque composé, ainsi qu'à l'EC₅₀ et au nombre d'équivalent Trolox/mol de composé. Les résultats montrent que les

stœchiométries réelles ne correspondent pas aux stœchiométries de base pour aucune des molécules. En effet, différentes études, notamment celle de Hollande *et al.* (2018), ont montré que le procédé d'abstraction directe de l'atome d'hydrogène du groupement phénol, suivi d'un transfert d'électron vers le radical DPPH•, n'était pas le seul mécanisme d'action pendant la réaction du radical DPPH• avec des phénols et qu'il existe des voies potentielles de régénération des noyaux catéchols comme nous l'avons évoqué plus haut. Ce type de régénération conduit à la formation de produits secondaires tels que des dimères de phénols ou des quinones methides, produits secondaires capables de réagir avec les radicaux DPPH•, et d'augmenter ainsi la stœchiométrie réelle de la molécule. Du fait de la structure de l'acide caféique, il y a plus de possibilité de régénérer des cycles phénoliques par rapport à l'acide sinapique ou le Trolox ce qui explique sa stœchiométrie réelle supérieure. Dans le cas de l'acide chlorogénique et des mono-esters d'acide caféique, l'encombrement stérique pourrait diminuer l'accessibilité des positions libres du cycle aromatique susceptibles de conduire à une régénération par couplage radicalaire.

4.3.4. Capacité anti radicalaire des di-esters en milieu homogène

Les valeurs obtenues par le test DPPH des di-esters de l'acide sinapique et de l'acide caféique peuvent être observées sur la Figure 60. Pour les di-esters d'acide sinapique (Figure 60-A), la capacité antioxydante la plus importante a été obtenue avec le di-ester contenant 2 carbones entre chaque unité sinapate ($1,03 \pm 0,04$ éq. Trolox). Cette valeur est cependant légèrement inférieure à celle obtenue pour l'acide sinapique. Cette observation avait déjà été faite par Reano *et al.* (2015) qui ont synthétisé le di-ester de l'acide sinapique avec le 1,4-butanediol et constaté que sa capacité anti radicalaire déterminée par le test DPPH était du même ordre de grandeur que celle de l'acide sinapique. Logiquement, il pourrait être attendu une augmentation, voire un doublement, de la capacité antiradicalaire du fait de la présence d'un deuxième cycle phénolique dans la structure des di-esters. Il n'en est rien dans notre étude, puisque que l'on observe même une diminution de la capacité antiradicalaire à mesure que s'accroît la longueur de la chaîne alkyle entre les cycles phénoliques. Il est possible ici que des interactions intramoléculaires entre cycles phénoliques soient à l'origine de ce comportement singulier avec une influence négative sur les phénomènes de régénération évoqués précédemment.

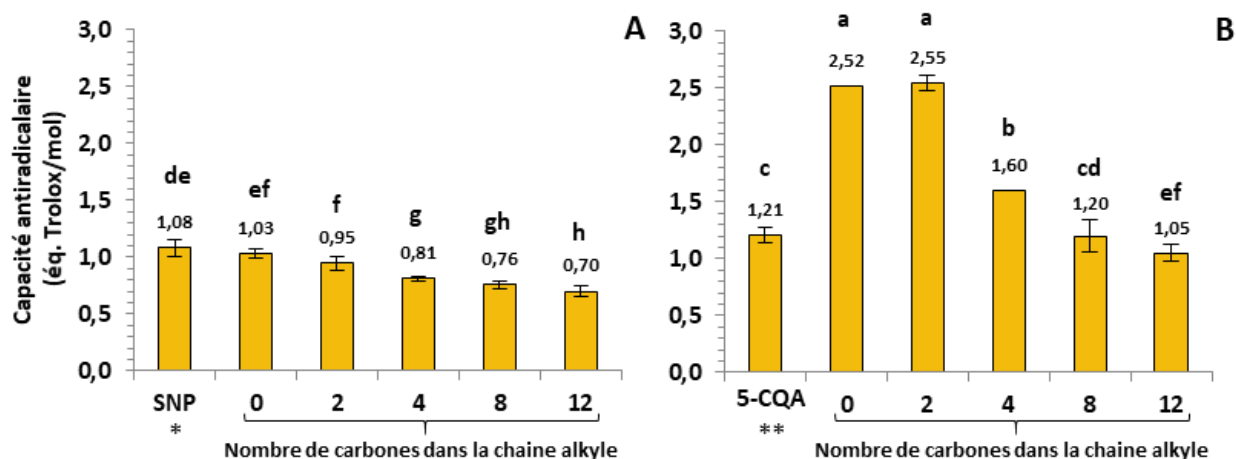


Figure 60 : Capacité antiradicalaire des di-esters d'acide sinapique (A) et d'acide caféique (B) à chaîne alkyle de 2 à 12 carbones. Note : *SNP = sinapine et **AC = acide chlorogénique. Les valeurs sont des moyennes \pm ET (n=4). Les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, $p \geq 0,05$.

Concernant les diesters d'acide caféique (Figure 60-B), l'allongement de la chaîne alkyle (entre les cycles phénoliques) s'est traduit de façon fort différente sur l'activité antiradicalaire. Tout d'abord, il est étonnant de constater que la capacité antiradicalaire du di-ester à chaîne alkyle à deux carbones (n=1) est environ deux fois supérieure à celle de l'acide chlorogénique ($2,55 \pm 0,9$ ég. Trolox/mol contre $1,21 \pm 0,10$ ég. Trolox/mol) alors qu'elle n'est pas significativement différente de celle de l'acide caféique ($2,52 \pm 0,0$ ég. Trolox/mol). Dans l'étude réalisée par Cho *et al.* (2016), les capacités antiradicalaires de différents isomères naturels d'acide di-caféoylquinique (diesters naturels d'acide caféique et d'acide quinique) se sont avérées deux fois supérieures à celle de l'acide 3-caféoylquinique (mono-ester naturel de l'acide caféique) mais du même ordre de grandeur que celle de l'acide caféique. Ceci montre l'influence de l'esterification de la fonction carboxylique de l'acide caféique sur sa capacité à piéger des radicaux libres, mais également l'impact de la présence de deux cycles caféoyle dans un proche environnement. En outre, les résultats obtenus dans cette étude ont indiqué que, pour l'acide caféique, il n'existait pas de relation d'additivité entre la capacité antioxydante et le nombre cycles phénoliques présentes sur la molécule. Ceci avait été mis également en évidence par Goupy *et al.* (2003) qui ont étudié les cinétiques de transfert d'hydrogène des acides caféique, chlorogénique et différents isomères d'acide di-caféoylquinique. Ici, les auteurs ont montré qu'une seule des unités

caféoylquinique des acides di-caféoylquiniques réagissait avec le radical DPPH• tandis que l'autre unité restait sous une forme rigide et non réactive.

Par ailleurs, une diminution de la capacité antiradicalaire des di-esters est observée avec l'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle. Cette diminution est probablement due à l'éloignement des cycles phénoliques, hypothèse soutenue par les résultats de l'étude réalisée par Saito *et al.* (2005). Dans cette étude, les auteurs ont démontré que la position et la distance des unités caféoylquinique dans différents isomères d'acide di-caféoylquinique avait une importance capitale dans leur capacité à piéger des électrons libres. En effet, ils expliquent que les réactions entre les radicaux libres et les acides di-caféoylquiniques dans des mélanges alcooliques (comme le méthanol ou l'éthanol) ont lieu en deux étapes. Premièrement, les deux unités catéchol des di-caféoylquiniques sont rapidement convertit en *o*-quinones. Il s'en suit l'addition d'une molécule de méthanol sur une des deux structures *o*-quinones puis le couplage intramoléculaire des deux structures *o*-quinones. Ce couplage permet la régénération d'une structure catéchol qui peut ensuite réagir avec un autre radical libre. Finalement, ils ont montré que plus les unités caféoylquiniques étaient proches, plus le couplage des structure *o*-quinones était facile entraînant ainsi une augmentation de leurs capacités à piéger des radicaux libres. De ce fait, il est raisonnable de penser que ce phénomène ait également lieu avec les di-esters synthétisés dans cette étude expliquant ainsi la perte de la capacité antioxydante avec l'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle. Finalement, il est intéressant de noter que dans la plupart des études décrivant les capacités antioxydantes des acides di-caféoylquiniques, les isomères contenant des unités caféoylquiniques séparées par deux carbones possèdent les capacité antioxydantes les plus élevés, comme dans notre étude.

4.4. CONCLUSION

Les données de la littérature, concernant la lipophilisation des acides phénoliques ont montré jusqu'à présent que la modulation du caractère hydrophobe des phénolipides résultants était accompagnée d'une variation significative de la capacité antioxydante en milieu hétérogène avec l'existence d'un effet de seuil caractérisé par un maximum d'activité pour un phénolipide à longueur de chaîne particulière. Dans notre étude, la mono-estérification de l'acide sinapique

avec les différents diols aliphatiques a eu des effets différents, avec une baisse de la capacité antioxydante de l'acide sinapique en milieu émulsionné. Nous avons vu que la présence d'une fonction hydroxyle en bout de chaîne alkyle des mono-esters ne permettait pas d'améliorer la capacité antioxydante de l'acide sinapique et qu'il y avait au contraire une chute d'activité probablement liée aux propriétés physico-chimiques particulières des monoesters.

En revanche, pour les mono-esters d'acide caféique ainsi que pour les deux séries de di-esters, un effet de seuil de l'hydrophobie sur la capacité antioxydante a pu être observé, avec un maximum d'activité pour les molécules contenant une chaîne à quatre atomes de carbone. Dans le cas des mono-esters d'acide caféique, l'amélioration de l'activité antioxydante avec l'allongement de la chaîne alkyle s'est avérée beaucoup moins marquée en comparaison des résultats de l'étude de Sørensen *et al.* (2014) où l'estérification de l'acide caféique avec l'octanol a permis d'augmenter d'environ 4 fois la capacité antioxydante dans la même émulsion (Test CAT). D'autre part, la capacité antioxydante des di-esters n'a jamais atteint la valeur attendue, c'est-à-dire, deux fois celle de l'acide ou du mono-ester correspondants. Une explication possible serait la perte de mobilité et de transport aux interfaces des molécules en raison de l'établissement d'interactions intramoléculaires ou de phénomènes d'auto-assemblage en micelles ou co-micelles avec l'émulsifiant de l'interface. Au regard de ces résultats, l'intérêt des di-esters d'acides phénoliques comme antioxydants en émulsion peut donc sembler limité du fait qu'il suffit théoriquement d'utiliser deux fois plus d'acide de départ pour doubler la capacité antioxydante. Cependant, il faut prendre en considération que l'amélioration de la capacité antioxydante relève davantage de la partition des molécules dans le milieu hétérogène que de leur quantité dans le système pris dans son ensemble. Par exemple, une mole de di-ester serait peut-être plus efficace à lutter contre l'oxydation lipidique dans un milieu hétérogène par rapport à deux moles d'acide de départ du fait que le di-ester serait positionné préférentiellement à l'interphase huile/eau. Pour valider cette hypothèse, des travaux complémentaires visant à déterminer précisément les caractéristiques des diesters (Log P, tension de surface), leur état physique ainsi que leur positionnement dans l'émulsion (concentration micellaire critique, type d'aggrégat...) restent indispensables.

Concernant l'activité antiradicalaire en milieu homogène, la mono- et la di-estérification de l'acide sinapique n'a pas permis d'améliorer sa capacité à piéger le radical DPPH[•]. Par contre, l'estérification de l'acide caféique avec les diols aliphatiques (ou avec l'acide quinique sous forme d'acide chlorogénique) ne s'est pas traduite par une amélioration de l'activité antiradicalaire qui s'est avérée, dans le cas du di-ester à chaîne alkyle à deux carbones, au mieux égale à celle de l'acide caféique.

En outre, ces résultats ont permis de montrer, pour une même molécule, l'influence du milieu réactionnel sur l'expression de son activité antioxydante. En effet, la méthode CAT permet d'avoir une meilleure idée de la capacité antioxydante des différents esters dans un milieu hétérogène complexe comportant des interfaces et préfigurant des systèmes réels alimentaires ou cosmétiques. La méthode DPPH quant à elle permet d'appréhender les différents mécanismes d'actions des différents esters et de pouvoir les comparer avec des molécules évaluées dans d'autres études par la même méthode. Cependant, d'après les résultats obtenus en milieu homogène ou en milieu hétérogène, il reste difficile de conclure définitivement sur l'intérêt ou pas de la synthèse des di-esters des acides phénoliques. Il serait par exemple intéressant d'évaluer leur capacité antioxydante dans des systèmes réels comme les huiles végétales insaturées (phase continue homogène de type « bulk oil ») et de comparer leur efficacité à celles d'autres conservateurs, synthétiques ou naturels, couramment utilisés.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La filière des plantes oléagineuses, telles que le colza et le tournesol, est un acteur économique et industriel majeur en France, au travers de la production d'huiles végétales et de protéines à des fins alimentaires (huiles de tables, tourteaux pour l'alimentation animale) et non-alimentaires (biodiesel, chimie verte). Il s'agit néanmoins d'une filière fragile, soumise aux fluctuations des marchés des matières premières, à la forte concurrence d'autres huiles végétales majeures et bon marché (comme l'huile de palme provenant principalement d'Asie), ainsi qu'à l'impact déjà visible du changement climatique sur les récoltes. De ce fait, la nécessité de trouver d'autres voies de valorisation des huiles, mais également des tourteaux de colza et de tournesol est à l'heure actuelle de prime importance. Dans ce contexte, la valorisation de la fraction phénolique de ces tourteaux pourrait représenter un moyen intéressant d'apporter de la valeur ajoutée à ces co-produits. Dans le cas du colza, cette fraction phénolique est principalement constituée d'esters d'acide sinapique (sinapoylcholine, di- et tri-sinapoyl esters) et, pour le tournesol, d'esters d'acide caféique (acides caféoylquiniques et di-caféoylquiniques). Ces molécules, considérées comme des facteurs antinutritionnels, possèdent néanmoins des propriétés bioactives et physico-chimiques intéressantes et largement sous exploitées à ce jour. Par conséquent, tout type de procédé permettant la récupération des composés phénoliques (sans dégradation des autres constituants comme les protéines), et la production de tourteaux à valeur nutritionnelle améliorée serait doublement profitable à la filière. Une fois extraite, la fraction phénolique pourrait servir de source d'acides phénoliques convertibles en précurseurs de polymères, antioxydants ou molécules bioactives. C'est avec ce double objectif de valorisation que les travaux de cette thèse ont été entrepris, dans un contexte plus global de bio-raffinerie et de chimie verte.

(i) La première partie de ce manuscrit de thèse a été consacrée à la caractérisation chimique des tourteaux de colza et de tournesol industriels et non-industriels avec un focus particulier sur la caractérisation fine des composés phénoliques simples.

Cette étude a permis de fournir une liste détaillée des différents composés phénoliques présents dans les tourteaux de colza et tournesol et a confirmé l'effet négatif des traitements thermiques subis par les tourteaux industriels sur les teneurs en composés phénoliques totaux (CPT) et individuels. Ces analyses ont été complétées par la quantification des autres composés d'intérêts (protéines, lignine, lipides, etc.) dans les tourteaux non-industriels. Enfin, les concentrations en protéines et CPT des coques, pellicules et amandes de graines de colza et de tournesol (délipidées et non-traitées thermiquement) ont été déterminées, ce qui a permis par la suite d'évaluer l'efficacité des procédés de fractionnement par voie sèche.

(ii) La deuxième partie de ce manuscrit de thèse a été consacrée aux procédés de séparation de la fraction phénolique des tourteaux de colza et de tournesol.

Dans un premier temps, une étude sur le fractionnement par voie sèche des tourteaux de colza et de tournesol non-industriels a été réalisée. Dans cette partie, nous avons pu montrer qu'un broyage adéquat, était nécessaire pour dissocier efficacement les corps protéiques localisés dans les matrices cellulaires et générer des farines aux profils granulométriques adaptés à la séparation ultérieure des protéines et composés phénoliques. Des deux types de séparation étudiés, le tri électrostatique c'est avéré le plus efficace, avec un enrichissement (i) en protéines de 50% pour le colza et de 97% pour le tournesol et (ii) en composés phénoliques totaux de 55% et 81% respectivement. Ces gains importants en protéines et composés phénoliques ont été directement relié à la capacité du tri électrostatique à concentrer les corps protéiques. Cette technique nécessite néanmoins des étapes de recyclage pour arriver à des rendements de récupération de l'ordre de 30%. Des modifications du dispositif sont néanmoins envisageables comme par exemple, l'augmentation de la surface des électrodes et l'intégration d'un système automatique de récupération en continu des fractions des électrodes. En outre, une optimisation du débit d'alimentation en matière première pourrait contribuer à une meilleure dispersion des particules et donc à une meilleure charge de ces dernières.

Par ailleurs, quels que soient le tourteau (colza ou tournesol) et le type de séparation (tri électrostatique ou turbo-séparation), les composés phénoliques ont toujours été séparés avec la fraction protéique montrant ainsi le lien intime qui existe entre ces composés, qui ne peuvent

finalement être séparés par ces techniques de fractionnement. Néanmoins, même si le but initial de cette étude était d'isoler les composés phénoliques des autres constituants, les fractionnements mis en œuvre peuvent être considérés comme une étape d'enrichissement et de pré-purification réalisée en conditions non-dénaturantes.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé une étude exploratoire de l'extraction des composés phénoliques des tourteaux de colza et de tournesol par des mélanges hydro-alcooliques à base d'éthanol et d'isopropanol, en substitution au méthanol. Les mélanges EtOH/H₂O 85:15 (v/v) et 80:20 (v/v), appliqués respectivement au colza et au tournesol, se sont avérés aussi efficaces que le méthanol. A efficacité équivalente, ces mélanges contiennent moins d'eau que ceux à base d'isopropanol, ce qui constitue un avantage important si la co-extraction de composés polaires (peptides, sucres etc...) doit être évitée. Par ailleurs, l'origine biosourcée de l'éthanol est un autre élément à prendre en considération dans un contexte de durabilité du procédé. En complément de ces travaux exploratoires, il conviendrait donc d'évaluer l'impact de la co-extraction de ces composés indésirables et d'optimiser les autres paramètres d'extraction que nous avons maintenu fixes dans cette étude.

(iii) La troisième partie de cette thèse a été dédiée à l'utilisation de trois cinnamoyl estérases pour l'hydrolyse des esters d'acides phénoliques présents dans les tourteaux et leurs extraits.

L'utilisation des enzymes AnFaeB et ChIE a permis l'hydrolyse des esters d'acide caféique présents dans les tourteaux de tournesol (industriel et non-industriel). En revanche, une diminution progressive de la teneur en composés phénoliques individuels et totaux a été observée uniquement pendant l'hydrolyse du tourteau non-industriel. Cette dégradation a été attribuée à la présence d'enzymes endogènes (tels que les polyphénols oxydases, PPO), désactivés par les traitements thermiques appliqués au tourteau industriel. Pour pallier ce problème, l'hydrolyse a été réalisée sur l'extrait méthanolique sec du tourteau non-industriel de tournesol et aucune perte en composé phénolique n'a alors été constatée. En termes de spécificité, l'enzyme AnFaeB a permis l'hydrolyse quantitative de tous les esters d'acides caféiques, tandis que l'enzyme ChIE s'est révélée inactive vis-à-vis de l'acide 3-caféoylquinique.

Pour le tourteau de colza non-industriel, l'utilisation de l'enzyme AnFaeA a permis l'hydrolyse de la plupart des esters d'acide sinapique, à l'exception des dérivés contenant des unités kaempférols et certains di- et tri-sinapoyl esters. En revanche, une diminution de l'ordre de 16 % de la teneur CPT a été observée (uniquement pendant l'étape de pré-incubation). De ce fait, l'hydrolyse de l'extrait méthanolique sec du tourteau non-industriel de colza a été réalisée pour éviter la dégradation des composés phénoliques. Ainsi, la teneur en CPT a été conservée constante et sans dégradation au cours des différents temps d'incubation. Néanmoins, l'existence de réactions secondaires de transfert d'acyle a limité considérablement les teneurs finales en acide sinapique.

Finalement, le substrat le plus adapté à la production d'acide sinapique par traitement enzymatique avec l'enzyme AnFaeA, est le tourteau industriel de colza avec un rendement maximal attendu d'environ 65%. Pour le tournesol, l'enzyme AnFaeB et l'extrait méthanolique représentent la meilleure combinaison permettant une hydrolyse rapide et une production quantitative d'acide caféique (rendement = 95%).

(iv) Enfin, dans la dernière partie, nous avons synthétisé des mono- et di-esters d'acides sinapique et caféique et évalué leur capacité antioxydante en milieu hétérogène et homogène

Dans un premier temps, la mono-estérification des acides phénoliques en milieu fondu a été réalisée avec des diols aliphatiques contenant des longueurs de chaînes alkyles entre 2 et 12 carbones. Après purification, de bons rendements de récupération ont été obtenus avec les diols contenant des chaînes alkyles entre deux et quatre carbones (80-70%). En revanche, l'augmentation de la chaîne alkyle a conduit vers une chute du rendement de récupération (60-30%) essentiellement liée à des problèmes de purification. Par la suite, les di-esters d'acides phénoliques ont été synthétisés par réaction de Mitsunobu. Pour ces synthèses, la conversion incomplète des substrats, l'existence de réactions secondaires et les difficultés de purification sont vraisemblablement à l'origine des faibles rendements de récupération observés (15-50%).

Dans un deuxième temps, la capacité antioxydante des mono- et di-esters d'acides phénoliques a été évaluée en milieu hétérogène par le test CAT (Conjugated Autoxidized Triene Assay), en milieu homogène par le test DPPH• et les résultats exprimés en équivalent Trolox par mole de

composé (éq. Trolox/mol). En milieu hétérogène, la mono-estérification de l'acide sinapique (valeur CAT = $2,50 \pm 0,13$ éq. Trolox/mol) et de l'acide caféique ($2,44 \pm 0,05$ éq. Trolox/mol) avec les différents diols aliphatiques ne s'est pas traduite par un gain d'activité antioxydante et aucun effet de seuil n'a été observé contrairement aux études réalisées par d'autres auteurs sur des séries de phénolipides à base d'acides hydroxycinnamiques (chlorogénique, rosmarinique) et d'alcools gras. Dans notre cas, nous avons relié ces résultats inattendus (i) au caractère hydrophobe beaucoup plus marqué des acides sinapique et caféique de départ ainsi (ii) qu'à la présence du groupement hydroxyle à l'extrémité de la chaîne alkyle, défavorable à une localisation préférentielle des mono-esters à l'interface. En revanche, un effet de seuil a été observé pour les deux familles de di-esters, avec un optimum correspondant à une chaîne alkyle à quatre carbones (valeur CAT = $3,49 \pm 0,29$ éq. Trolox/mol composé et $4,19 \pm 0,05$ éq. Trolox/mol composé, respectivement). Enfin, en milieu homogène, la mono- et la di-estérification des acides sinapique et caféique s'est traduite dans tous les cas par une capacité antiradicalaire des molécules résultantes inférieure à celle des acides de départ correspondants.

Ce travail de thèse, dont les résultats sont résumés plus haut, a eu pour objectif de démontrer qu'un procédé intégré de valorisation des tourteaux de colza et de tournesol, allant du fractionnement des matières premières à la synthèse de molécules multifonctionnelles, pouvait être une alternative à l'utilisation exclusive de ces matières premières en alimentation animale. Si le fractionnement par voie sèche a montré son intérêt comme voie de pré-purification de fractions d'intérêt à l'échelle du laboratoire, une étude plus approfondie reste nécessaire pour en déterminer la faisabilité à plus grande échelle, notamment en termes de coûts et de dépenses énergétiques, aspects que nous n'avons pas pu aborder dans ce travail. Malgré ces résultats intéressants, le fractionnement par voie sèche n'a pu répondre à l'objectif de séparer les composés phénoliques des protéines, la seule solution à disposition demeurant l'extraction par solvant. Concernant ce point, nous avons proposé des mélanges à base d'eau et d'éthanol en substitution au méthanol et aussi efficace que ce dernier à extraire les composés phénoliques. Dans cet esprit, il serait intéressant d'envisager l'emploi de l'éthanol beaucoup plus en amont du procédé de trituration, notamment en substitution à l'hexane lors de l'extraction de l'huile résiduelle après pressage. La co-extraction de l'huile et des composés phénoliques des tourteaux

avec de l'éthanol puis l'addition d'eau en quantité adéquate pourrait conduire à trois phases, l'huile, la phase hydro-alcoolique contenant les composés phénoliques et enfin le tourteau délipidé et déphénolisé.

Concernant la production des mono- et di-esters, nous sommes tout à fait conscients que les voies de synthèse mises en oeuvre ne sont vraisemblablement ni les plus efficaces, ni les plus adaptées d'un point de vue environnemental. Aussi, dans l'optique de développer un procédé durable et efficient, cette partie mériterait d'être revisitée en profondeur, notamment par la mise en oeuvre de réactions stoechiométriques et l'emploi de catalyseur hétérogènes. Dans ce sens, il serait intéressant de tester en condition de synthèse les enzymes que nous avons utilisées pour l'hydrolyse des esters d'acide sinapique et caféique et tout particulièrement l'enzyme AnFaeA qui a montré une activité de transfert d'acyle.

Pour ce qui est des activités bioactives et physico-chimiques des di-esters d'acide sinapique et caféique, nous avons pu mettre en évidence la capacité antioxydante relativement élevée de ces composés en milieu émulsionné, même si elle reste largement inférieure à celle d'autres phénolipides, comme le rosmarinate d'octyle par exemple (valeur CAT = $15,31 \pm 1,39$ éq. Trolox/mol). En complément de ce travail, il serait intéressant de mesurer leurs activités antioxydantes dans d'autres types de systèmes faisant intervenir des interfaces ou des membranes lipidiques telles les suspensions de liposomes ou les milieux cellulaires mais également d'identifier leurs propriétés anti-UV et même antimicrobiennes. Dans ce sens, nous avons initié des travaux avec l'équipe du Dr. Chantal Cabello (UMR Dynamique Musculaire & Métabolisme « DMEM » -INRA- Université de Montpellier) pour la détermination des capacités antioxydantes des mono- et di-esters d'acide sinapique et caféique en milieu cellulaire.

Notons enfin que d'autres valorisations des mono- et di-esters d'acides sinapique ou caféique peuvent être également envisagées dans le domaine des matériaux, comme additifs, comonomères ou comme précurseurs de résine epoxy par exemple. Dans ce sens, la collaboration de longue date avec le Dr Chahinez Aouf (UMR IATE - INRA Montpellier) pourrait être mise à profit pour développer ces aspects inexplorés dans ce travail de thèse.

Références bibliographiques

- Aider, M., Barbana, C., 2011. Canola proteins: composition, extraction, functional properties, bioactivity, applications as a food ingredient and allergenicity – A practical and critical review. *Trends Food Sci. Technol.* 22, 21–39.
- Alamed, J., Chaityasit, W., McClements, D.J., Decker, E.A., 2009. Relationships between Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity in Foods. *J. Agric. Food Chem.* 57, 2969–2976.
- Alasalvar, C., Grigor, J.M., Zhang, D., Quantick, P.C., Shahidi, F., 2001. Comparison of Volatiles, Phenolics, Sugars, Antioxidant Vitamins, and Sensory Quality of Different Colored Carrot Varieties. *J. Agric. Food Chem.* 49, 1410–1416.
- Amarowicz, R., Naczek, M., Shahidi, F., 2000. Antioxidant activity of crude tannins of canola and rapeseed hulls. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77, 957–961.
- An, C.-B., Li, D., Liang, R., Bu, Y.-Z., Wang, S., Zhang, E.-H., Wang, P., Ai, X.-C., Zhang, J.-P., Skibsted, L.H., 2011. Chain Length Effects in Isoflavonoid Daidzein Alkoxy Derivatives as Antioxidants: A Quantum Mechanical Approach. *J. Agric. Food Chem.* 59, 12652–12657.
- Aouf, C., Lecomte, J., Villeneuve, P., Dubreucq, E., Fulcrand, H., 2012. Chemo-enzymatic functionalization of gallic and vanillic acids: synthesis of bio-based epoxy resins prepolymers. *Green Chem.* 14, 2328.
- Appendino, G., Minassi, A., Daddario, N., Bianchi, F., Tron, G.C., 2003. Chemoselective Esterification of Phenolic Acids and Alcohols. *ChemInform* 34.
- Asad, M., Brahim, M., Ziegler-Devin, I., Boussetta, N., Brosse, N., 2017. Chemical Characterization of Non-Saccharidic and Saccharidic Components of Rapeseed Hulls and Sunflower Shells. *BioResources* 12.
- Asther, Michèle, Estrada Alvarado, M.I., Haon, M., Navarro, D., Asther, Marcel, Lesage-Meessen, L., Record, E., 2005. Purification and characterization of a chlorogenic acid hydrolase from *Aspergillus niger* catalysing the hydrolysis of chlorogenic acid. *J. Biotechnol.* 115, 47–56.
- Asther, Michele, Haon, M., Delattre, M., Lesage-Meessen, L., Labat, M., Asther, Marcel, 2002. Feruloyl esterase from *Aspergillus niger* a comparison of the production in solid state and submerged fermentation. *Process Biochem.* 7.

- Auger, B., Marnet, N., Gautier, V., Maia-Grondard, A., Leprince, F., Renard, M., Guyot, S., Nesi, N., Routaboul, J.-M., 2010. A Detailed Survey of Seed Coat Flavonoids in Developing Seeds of *Brassica napus* L. J. Agric. Food Chem. 58, 6246–6256.
- Balgavý, P., Devínsky, F., 1996. Cut-off effects in biological activities of surfactants. Adv. Colloid Interface Sci. 66, 23–63.
- Barakat, A., de Vries, H., Rouau, X., 2013. Dry fractionation process as an important step in current and future lignocellulose biorefineries: A review. Bioresour. Technol. 134, 362–373.
- Barakat, A., Jérôme, F., Rouau, X., 2015. A Dry Platform for Separation of Proteins from Biomass-Containing Polysaccharides, Lignin, and Polyphenols. ChemSusChem 8, 1161–1166.
- Barakat, A., Mayer-Laigle, C., Solhy, A., Arancon, R.A.D., de Vries, H., Luque, R., 2014. Mechanical pretreatments of lignocellulosic biomass: towards facile and environmentally sound technologies for biofuels production. RSC Adv 4, 48109–48127.
- Barakat, A., Rouau, X., 2014. New dry technology of environmentally friendly biomass refinery: glucose yield and energy efficiency. Biotechnol. Biofuels 7, 138.
- Basset, C., Kedidi, S., Barakat, A., 2016. Chemical- and Solvent-Free Mechanophysical Fractionation of Biomass Induced by Tribo-Electrostatic Charging: Separation of Proteins and Lignin. ACS Sustain. Chem. Eng. 4, 4166–4173.
- Batovska, D., Kishimoto, T., Bankova, V., Kamenarska, Z., Ubukata, M., 2005. Synthesis of Some Phenylpropanoid Monoglycerides via the Mitsunobu Protocol. Molecules 10, 552–558.
- Baumert, A., Milkowski, C., Schmidt, J., Nimtz, M., Wray, V., Strack, D., 2005. Formation of a complex pattern of sinapate esters in *Brassica napus* seeds, catalyzed by enzymes of a serine carboxypeptidase-like acyltransferase family? Phytochemistry 66, 1334–1345.
- Bayrasy, C., Chabi, B., Laguerre, M., Lecomte, J., Jublanc, É., Villeneuve, P., Wrutniak-Cabello, C., Cabello, G., 2013. Boosting Antioxidants by Lipophilization: A Strategy to Increase Cell Uptake and Target Mitochondria. Pharm. Res. 30, 1979–1989.
- Benoit, I., Asther, M., Bourne, Y., Navarro, D., Canaan, S., Lesage-Meessen, L., Herweijer, M., Coutinho, P.M., Asther, M., Record, E., 2007. Gene Overexpression and Biochemical Characterization of the

- Biotechnologically Relevant Chlorogenic Acid Hydrolase from *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5624–5632.
- Benoit, I., Danchin, E.G.J., Bleichrodt, R.-J., de Vries, R.P., 2008. Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity. *Biotechnol. Lett.* 30, 387–396.
- Benoit, I., Navarro, D., Marnet, N., Rakotomanomana, N., Lesage-Meessen, L., Sigoillot, J.-C., Asther, Marcel, Asther, Michèle, 2006. Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compounds from agro-industrial by-products. *Carbohydr. Res.* 341, 1820–1827.
- Bernini, R., Crisante, F., Barontini, M., Tofani, D., Balducci, V., Gambacorta, A., 2012. Synthesis and Structure/Antioxidant Activity Relationship of Novel Catecholic Antioxidant Structural Analogues to Hydroxytyrosol and Its Lipophilic Esters. *J. Agric. Food Chem.* 60, 7408–7416.
- Bonnin, E., Saulnier, L., Brunel, M., Marot, C., Lesage-Meessen, L., Asther, M., Thibault, J.-F., 2002. Release of ferulic acid from agroindustrial by-products by the cell wall-degrading enzymes produced by *Aspergillus niger* I-1472. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 1000–1005.
- Borredon, M.-E., Berger, M., Daguët, S., Labalette, F., Merrien, A., Mouloungui, Z., Raoul, Y., 2011. Débouchés actuels et futures du tournesol produit en France—Critères de qualité. *Innov. Agron.* 14, 19–38.
- Cai, R., Arntfield, S.D., 2001. A rapid high-performance liquid chromatographic method for the determination of sinapine and sinapic acid in canola seed and meal. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78, 903–910.
- Campbell, L., Rempel, C., Wanasundara, J., 2016. Canola/Rapeseed Protein: Future Opportunities and Directions—Workshop Proceedings of IRC 2015. *Plants* 5, 17.
- Carré, P., Citeau, M., Robin, G., Estorges, M., 2016. Hull content and chemical composition of whole seeds, hulls and germs in cultivars of rapeseed (*Brassica napus*). *OCL* 23, A302.
- Chedea, V.S., Choueiri, L., Jisaka, M., Kefalas, P., 2012. o-Quinone involvement in the prooxidant tendency of a mixture of quercetin and caffeic acid. *Food Chem.* 135, 1999–2004.
- Cherubini, F., 2010. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Convers. Manag.* 51, 1412–1421.

- Cho, J.-Y., Kim, J., Lee, Y., Lee, H., Shim, H., Lee, J., Kim, S.-J., Ham, K.-S., Moon, J.-H., 2016. Four New Dicaffeoylquinic Acid Derivatives from Glasswort (*Salicornia herbacea* L.) and Their Antioxidative Activity. *Molecules* 21, 1097. <https://doi.org/10.3390/molecules21081097>
- Chuetor, S., Luque, R., Barron, C., Solhy, A., Rouau, X., Barakat, A., 2015. Innovative combined dry fractionation technologies for rice straw valorization to biofuels. *Green Chem* 17, 926–936.
- Crepin, V.F., Faulds, C.B., Connerton, I.F., 2004. Functional classification of the microbial feruloyl esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 647–652.
- De Leonardis, A., Macciola, V., Di Domenico, N., 2005. A first pilot study to produce a food antioxidant from sunflower seed shells (*Helianthus annuus*). *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 107, 220–227.
- Durand, E., Bayrasy, C., Laguerre, M., Barouh, N., Lecomte, J., Durand, T., Balas, L., Wrutniak-Cabello, C., Cabello, G., Villeneuve, P., 2015. Regioselective synthesis of diacylglycerol rosmarinates and evaluation of their antioxidant activity in fibroblasts: Diacylglycerol rosmarinates as novel antioxidants. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 117, 1159–1170.
- Durkee, A.B., 1971. The nature of tannin in rapeseed (*Brassica campestris*). *Phytochemistry* 10, 1583–1585.
- Estimations FranceAgriMer, 2018. Marché des oleo-protéagineux
- Evon, P., Vinet, J., Labonne, L., Rigal, L., 2015. Influence of thermo-pressing conditions on the mechanical properties of biodegradable fiberboards made from a deoiled sunflower cake. *Ind. Crops Prod.* 65, 117–126.
- Faulds, C.B., 2010. What can feruloyl esterases do for us? *Phytochem. Rev.* 9, 121–132.
- Faulds, C.B., Williamson, G., 2018. Purification and characterization of a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*: specificity for the phenolic moiety and binding to microcrystalline cellulose 9.
- Figuerola-Espinoza, M.C., Laguerre, M., Villeneuve, P., Lecomte, J., 2013. From phenolics to phenolipids: Optimizing antioxidants in lipid dispersions. *Lipid Technol.* 25, 131–134.
- Figuerola-Espinoza, M.-C., Villeneuve, P., 2005. Phenolic Acids Enzymatic Lipophilization. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2779–2787.

- Fine, F., Lucas, J.-L., Chardigny, J.-M., Redlingshöfer, B., Renard, M., 2015. Food losses and waste in the French oilcrops sector. *OCL* 22, A302.
- Frankel, E.N., 1996. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food Chem.* 57, 51–55.
- Galbe, M., Zacchi, G., 2012. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biomass Bioenergy, International Conference on Lignocellulosic ethanol* 46, 70–78.
- Gaspar, A., Garrido, E.M., Esteves, M., Quezada, E., Milhazes, N., Garrido, J., Borges, F., 2009. New insights into the antioxidant activity of hydroxycinnamic acids: Synthesis and physicochemical characterization of novel halogenated derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 44, 2092–2099.
- Gaspar, A., Martins, M., Silva, P., Garrido, E.M., Garrido, J., Firuzi, O., Miri, R., Saso, L., Borges, F., 2010. Dietary Phenolic Acids and Derivatives. Evaluation of the Antioxidant Activity of Sinapic Acid and Its Alkyl Esters. *J. Agric. Food Chem.* 58, 11273–11280.
- Guitard, R., Nardello-Rataj, V. and Aubry, J.M., 2016. Theoretical and Kinetic Tools for Selecting Effective Antioxidants: Application to the Protection of Omega-3 Oils with Natural and Synthetic Phenols. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 1220.
- González, M.J., Medina, I., Maldonado, O.S., Lucas, R., Morales, J.C., 2015. Antioxidant activity of alkyl gallates and glycosyl alkyl gallates in fish oil in water emulsions: Relevance of their surface active properties and of the type of emulsifier. *Food Chem.* 183, 190–196.
- González-Pérez, S., Vereijken, J.M., 2007. Sunflower proteins: overview of their physicochemical, structural and functional properties. *J. Sci. Food Agric.* 87, 2173–2191.
- Gopalan, N., Nampoothiri, K.M., Szakacs, G., Parameswaran, B., Pandey, A., 2016. Solid-state fermentation for the production of biomass valorizing feruloyl esterase. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 7, 7–13.
- Gopalan, N., Rodríguez-Duran, L.V., Saucedo-Castaneda, G., Nampoothiri, K.M., 2015. Review on technological and scientific aspects of feruloyl esterases: A versatile enzyme for biorefining of biomass. *Bioresour. Technol.* 193, 534–544.
- Goupy, P., Dufour, C., Loonis, M., Dangles, O., 2003. Quantitative Kinetic Analysis of Hydrogen Transfer Reactions from Dietary Polyphenols to the DPPH Radical. *J. Agric. Food Chem.* 51, 615–622.

- Grajeda-Iglesias, C., Salas, E., Barouh, N., Bar?a, B., Panya, A., Figueroa-Espinoza, M.C., 2016. Antioxidant activity of protocatechuates evaluated by DPPH, ORAC, and CAT methods. *Food Chem.* 194, 749–757.
- Guimarães Drummond e Silva, F., Miralles, B., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Iglesias, A.H., Reyes Reyes, F.G., Netto, F.M., 2017. Influence of Protein–Phenolic Complex on the Antioxidant Capacity of Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) Products. *J. Agric. Food Chem.* 65, 800–809.
- Guo, S., Ge, Y., Na Jom, K., 2017. A review of phytochemistry, metabolite changes, and medicinal uses of the common sunflower seed and sprouts (*Helianthus annuus* L.). *Chem. Cent. J.* 11.
- Halliwell, B., 2008. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch. Biochem. Biophys.* 476, 107–112.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 125–126.
- Hansen, J.Ø., Skrede, A., Mydland, L.T., Øverland, M., 2017. Fractionation of rapeseed meal by milling, sieving and air classification—Effect on crude protein, amino acids and fiber content and digestibility. *Anim. Feed Sci. Technol.* 230, 143–153.
- Hatzakis, N.S., Smonou, I., 2005. Asymmetric transesterification of secondary alcohols catalyzed by feruloyl esterase from *Humicola insolens*. *Bioorganic Chem.* 33, 325–337.
- Hemery, Y., Holopainen, U., Lampi, A.-M., Lehtinen, P., Nurmi, T., Piironen, V., Edelman, M., Rouau, X., 2011. Potential of dry fractionation of wheat bran for the development of food ingredients, part II: Electrostatic separation of particles. *J. Cereal Sci.* 53, 9–18.
- Hemery, Y., Rouau, X., Dragan, C., Bilici, M., Beleca, R., Dascalescu, L., 2009. Electrostatic properties of wheat bran and its constitutive layers: Influence of particle size, composition, and moisture content. *J. Food Eng.* 93, 114–124.
- Hollande, L., Domenek, S., Allais, F., 2018. Chemo-Enzymatic Synthesis of Renewable Sterically-Hindered Phenolic Antioxidants with Tunable Polarity from Lignocellulose and Vegetal Oil Components. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 3358.
- Hu, Z.-Y., Hua, W., Zhang, L., Deng, L.-B., Wang, X.-F., Liu, G.-H., Hao, W.-J., Wang, H.-Z., 2013. Seed Structure Characteristics to Form Ultrahigh Oil Content in Rapeseed. *PLoS ONE* 8, e62099.

- Hüttner, S., Zezzi Do Valle Gomes, M., Iancu, L., Palmqvist, A., Olsson, L., 2017. Immobilisation on mesoporous silica and solvent rinsing improve the transesterification abilities of feruloyl esterases from *Myceliophthora thermophila*. *Bioresour. Technol.* 239, 57–65.
- Ikawa, M., Schaper, T.D., Dollard, C.A., Sasner, J.J., 2003. Utilization of Folin–Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1811–1815.
- Isikgor, F.H., Becer, C.R., n.d. Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Platform for Production of Bio-Based Chemicals and Polymers 61.
- Jafari, M., Rajabzadeh, A.R., Tabatabaei, S., Marsolais, F., Legge, R.L., 2016. Physicochemical characterization of a navy bean (*Phaseolus vulgaris*) protein fraction produced using a solvent-free method. *Food Chem.* 208, 35–41.
- Kammerer, D.R., Kammerer, J., Valet, R., Carle, R., 2014. Recovery of polyphenols from the by-products of plant food processing and application as valuable food ingredients. *Food Res. Int.*, 7th World Congress on Polyphenols Applications 65, Part A, 2–12.
- Karamać, M., Kosińska, A., Estrella, I., Hernández, T., Dueñas, M., 2012. Antioxidant activity of phenolic compounds identified in sunflower seeds. *Eur. Food Res. Technol.* 235, 221–230.
- Khattab, R., Eskin, M., Aliani, M., Thiyam, U., 2010. Determination of Sinapic Acid Derivatives in Canola Extracts Using High-Performance Liquid Chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 87, 147–155.
- Khattab, R.Y., Eskin, M.N.A., Thiyam-Hollander, U., 2014. Production of Canolol from Canola Meal Phenolics via Hydrolysis and Microwave-Induced Decarboxylation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 91, 89–97.
- Khokhar, S., Owusu Apenten, R.K., 2003. Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure–activity relations. *Food Chem.* 81, 133–140.
- Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K., Taniguchi, H., 2002. Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Related Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2161–2168.
- Kiokias, S., Varzakas, T., Oreopoulou, V., 2008. In Vitro Activity of Vitamins, Flavonoids, and Natural Phenolic Antioxidants Against the Oxidative Deterioration of Oil-Based Systems. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48, 78–93.

- Kreps, F., Vrbíková, L., Schmidt, Š., 2014. Industrial Rapeseed and Sunflower Meal as Source of Antioxidants 4, 11.
- Kroon, P.A., Williamson, G., Fish, N.M., Archer, D.B., Belshaw, N.J., 2000. A modular esterase from *Penicillium funiculosum* which releases ferulic acid from plant cell walls and binds crystalline cellulose contains a carbohydrate binding module: Modular cinnamoyl esterase from *P. funiculosum*. *Eur. J. Biochem.* 267, 6740–6752.
- Laguerre, M., Bayrasy, C., Lecomte, J., Chabi, B., Decker, E.A., Wrutniak-Cabello, C., Cabello, G., Villeneuve, P., 2013. How to boost antioxidants by lipophilization? *Biochimie* 95, 20–26.
- Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P., 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Prog. Lipid Res.* 46, 244–282.
- Laguerre, M., López Giraldo, L.J., Lecomte, J., Figueroa-Espinoza, M.-C., Baréa, B., Weiss, J., Decker, E.A., Villeneuve, P., 2010. Relationship between Hydrophobicity and Antioxidant Ability of “Phenolipids” in Emulsion: A Parabolic Effect of the Chain Length of Rosmarinate Esters. *J. Agric. Food Chem.* 58, 2869–2876.
- Laguerre, M., López Giraldo, L.J., Lecomte, J., Figueroa-Espinoza, M.-C., Baréa, B., Weiss, J., Decker, E.A., Villeneuve, P., 2009. Chain Length Affects Antioxidant Properties of Chlorogenate Esters in Emulsion: The Cutoff Theory Behind the Polar Paradox. *J. Agric. Food Chem.* 57, 11335–11342.
- Laguerre, M., López-Giraldo, L.J., Lecomte, J., Baréa, B., Cambon, E., Tchobo, P.F., Barouh, N., Villeneuve, P., 2008. Conjugated autoxidizable triene (CAT) assay: A novel spectrophotometric method for determination of antioxidant capacity using triacylglycerol as ultraviolet probe. *Anal. Biochem.* 380, 282–290.
- Laguerre, M., Wrutniak-Cabello, C., Chabi, B., López Giraldo, L.J., Lecomte, J., Villeneuve, P., Cabello, G., 2011. Does hydrophobicity always enhance antioxidant drugs? A cut-off effect of the chain length of functionalized chlorogenate esters on ROS-overexpressing fibroblasts: Cut-off effect of phenolipid antioxidants. *J. Pharm. Pharmacol.* 63, 531–540.
- Lammi, S., Barakat, A., Mayer-Laigle, C., Djenane, D., Gontard, N., Angellier-Coussy, H., 2018. Dry fractionation of olive pomace as a sustainable process to produce fillers for biocomposites. *Powder Technol.* 326, 44–53.
- Lecomte, J., Giraldo, L.J.L., Laguerre, M., Baréa, B., Villeneuve, P., 2010. Synthesis, Characterization and Free Radical Scavenging Properties of Rosmarinic Acid Fatty Esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 87, 615–620.

- Leung, J., Fenton, T.W., Mueller, M.M., Clandinin, O.R., 1979. Condensed tannins of rapeseed meal. *J. Food Sci.* 44, 1313–1317.
- Li, B.B., Smith, B., Hossain, M.M., 2006. Extraction of phenolics from citrus peels. *Sep. Purif. Technol.* 48, 189–196.
- Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., Kong, M., Li, L., Zhang, Q., Liu, Y., Chen, H., Qin, W., Wu, H., Chen, S., 2016. An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. *Molecules* 21, 1374.
- Lindström, L.I., Pellegrini, C.N., Hernández, L.F., 2007. Histological development of the sunflower fruit pericarp as affected by pre- and early post-anthesis canopy shading. *Field Crops Res.* 103, 229–238.
- Lopez de Arbina, A., Rezende, M.C., Aliaga, C., 2017. Cut-off effect of radical TEMPO derivatives in olive oil-in-water emulsions. *Food Chem.* 224, 342–346.
- Lopez Giraldo, L.J., 2009. Lipophilisation enzymatique de composés phénoliques et évaluation de leurs propriétés antioxydantes. *Ol. Corps Gras Lipides* 16, 273–275.
- López Giraldo, L.J., Laguerre, M., Lecomte, J., Figueroa-Espinoza, M.-C., Barouh, N., Baréa, B., Villeneuve, P., 2007. Lipase-catalyzed synthesis of chlorogenate fatty esters in solvent-free medium. *Enzyme Microb. Technol.* 41, 721–726.
- López-Giraldo, L.J., Laguerre, M., Lecomte, J., Figueroa-Espinoza, M.-C., Baréa, B., Weiss, J., Decker, E.A., Villeneuve, P., 2009. Kinetic and Stoichiometry of the Reaction of Chlorogenic Acid and Its Alkyl Esters against the DPPH Radical. *J. Agric. Food Chem.* 57, 863–870.
- Lopez-Giraldo, L.J., Laguerre, M., Lecomte, J., Figueroa-Espinoza, M.-C., Pina, M., Villeneuve, P., 2007. Lipophilisation de composés phénoliques par voie enzymatique et propriétés antioxydantes des molécules lipophilisées. *Ol. Corps Gras Lipides* 14, 51–59.
- Luigicioni, P., 2005. Analysis of volatile fraction, fixed oil and tegumental waxes of the seeds of two different cultivars of *Helianthus annuus*. *Food Chem.* 90, 713–717.
- Mailer, R.J., 2008. Anti-Nutritional Components, Fibre, Sinapine and Glucosinolate Content, in Australian Canola (*Brassica napus* L.) Meal. *J. Am. Oil Chem. Soc.* v. 85, 937–944.

- Masuda, T., Inai, M., Miura, Y., Masuda, A., Yamauchi, S., 2013. Effect of Polyphenols on Oxymyoglobin Oxidation: Prooxidant Activity of Polyphenols in Vitro and Inhibition by Amino Acids. *J. Agric. Food Chem.* 61, 1097–1104.
- McClements, D.J., Decker, E., 2018. Interfacial Antioxidants: A Review of Natural and Synthetic Emulsifiers and Coemulsifiers That Can Inhibit Lipid Oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 66, 20–35.
- Méndez, J., Lojo, M.I., 1968. Spectral behavior of some cinnamic acids. *Microchem. J.* 13, 232–235.
- Milkowski, C., Strack, D., 2010. Sinapate esters in brassicaceous plants: biochemistry, molecular biology, evolution and metabolic engineering. *Planta* 232, 19–35.
- Mota, F.L., Queimada, A.J., Pinho, S.P., and Macedo, E.A., 2008. Aqueous Solubility of Some Natural Phenolic Compounds. *Ind. & Eng. Chem. Research* 47 (15), 5182-5189.
- Naczek, M., Amarowicz, R., Pink, D., Shahidi, F., 2000. Insoluble Condensed Tannins of Canola/Rapeseed. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1758–1762.
- Naczek, M., Amarowicz, R., Sullivan, A., Shahidi, F., 1998. Current research developments on polyphenolics of rapeseed/canola: a review. *Food Chem.* 62, 489–502.
- Naczek, M., Shahidi, F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A* 1054, 95–111.
- Niu, Y., Jiang, M., Wan, C., Yang, M., Hu, S., 2013. Effect of Microwave Treatment on Sinapic Acid Derivatives in Rapeseed and Rapeseed Meal. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 90, 307–313.
- Odinot, E., Fine, F., Sigoillot, J.-C., Navarro, D., Laguna, O., Bisotto, A., Peyronnet, C., Ginies, C., Lecomte, J., Faulds, C., Lomascolo, A., 2017. A Two-Step Bioconversion Process for Canolol Production from Rapeseed Meal Combining an *Aspergillus niger* Feruloyl Esterase and the Fungus *Neolentinus lepideus*. *Microorganisms* 5, 67.
- Ozdal, T., Capanoglu, E., Altay, F., 2013. A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Res. Int.* 51, 954–970.
- Pająk, P., Socha, R., Gałkowska, D., Rożnowski, J., Fortuna, T., 2014. Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts. *Food Chem.* 143, 300–306.

- Panya, A., Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P., Weiss, J., McClements, D.J., Decker, E.A., 2010. Effects of Chitosan and Rosmarinate Esters on the Physical and Oxidative Stability of Liposomes. *J. Agric. Food Chem.* 58, 5679–5684.
- Pedrosa, M.M., Muzquiz, M., García-Vallejo, C., Burbano, C., Cuadrado, C., Ayet, G., Robredo, L.M., 2000. Determination of caffeic and chlorogenic acids and their derivatives in different sunflower seeds. *J. Sci. Food Agric.* 80, 459–464.
- Pelgrom, Pascale J. M., Berghout, J.A.M., van der Goot, A.J., Boom, R.M., Schutyser, M.A.I., 2014. Preparation of functional lupine protein fractions by dry separation. *LWT - Food Sci. Technol.* 59, 680–688.
- Pelgrom, Pascale J.M., Berghout, J.A.M., van der Goot, A.J., Boom, R.M., Schutyser, M.A.I., 2014. Preparation of functional lupine protein fractions by dry separation. *LWT - Food Sci. Technol.* 59, 680–688.
- Pelgrom, P.J.M., Vissers, A.M., Boom, R.M., Schutyser, M.A.I., 2013. Dry fractionation for production of functional pea protein concentrates. *Food Res. Int.* 53, 232–239.
- Peterson, G.L., 1979. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal. Biochem.* 100, 201–220.
- Pion, F., Ducrot, P.-H., Allais, F., 2014. Renewable Alternating Aliphatic-Aromatic Copolyesters Derived from Biobased Ferulic Acid, Diols, and Diacids: Sustainable Polymers with Tunable Thermal Properties. *Macromol. Chem. Phys.* 215, 431–439.
- Pion, F., Reano, A.F., Ducrot, P.-H., Allais, F., 2013. Chemo-enzymatic preparation of new bio-based bis- and trisphenols: new versatile building blocks for polymer chemistry. *RSC Adv.* 3, 8988.
- Porter, W.L., Black, E.D., Drolet, A.M., 1989. Use of polyamide oxidative fluorescence test on lipid emulsions: contrast in relative effectiveness of antioxidants in bulk versus dispersed systems. *J. Agric. Food Chem.* 37, 615–624.
- Preece, K.E., Hooshyar, N., Zuidam, N.J., 2017. Whole soybean protein extraction processes: A review. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 43, 163–172. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.07.024>
- Rawel, H.M., Meidtner, K., Kroll, J., 2005. Binding of Selected Phenolic Compounds to Proteins. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4228–4235.

- Reano, A.F., Chérubin, J., Peru, A.M.M., Wang, Q., Clément, T., Domenek, S., Allais, F., 2015. Structure–Activity Relationships and Structural Design Optimization of a Series of *p*-Hydroxycinnamic Acids-Based Bis- and Trisphenols as Novel Sustainable Antiradical/Antioxidant Additives. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 3, 3486–3496.
- Reddy, K.K., Ravinder, T., Kanjilal, S., 2012. Synthesis and evaluation of antioxidant and antifungal activities of novel ricinoleate-based lipoconjugates of phenolic acids. *Food Chem.* 134, 2201–2207.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 933–956.
- Ruxton, C.H.S., Reed, S.C., Simpson, M.J.A., Millington, K.J., 2004. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J. Hum. Nutr. Diet.* 17, 449–459.
- Sabally, K., Karboune, S., St-Louis, R., Kermasha, S., 2006. Lipase-catalyzed transesterification of trilinolein or trilinolenin with selected phenolic acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 83, 101–107.
- Sabally, K., Karboune, S., Yeboah, F.K., Kermasha, S., 2005. Lipase-Catalyzed Esterification of Selected Phenolic Acids With Linolenyl Alcohols in Organic Solvent Media. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 127, 017–028.
- Saito, S., Kurakane, S., Seki, M., Takai, E., Kasai, T., Kawabata, J., 2005. Radical scavenging activity of dicaffeoyloxycyclohexanes: Contribution of an intramolecular interaction of two caffeoyl residues. *Bioorg. Med. Chem.* 13, 4191–4199.
- Schroyen, M., Vervaeren, H., Van Hulle, S.W.H., Raes, K., 2014. Impact of enzymatic pretreatment on corn stover degradation and biogas production. *Bioresour. Technol.* 173, 59–66.
- Schutyser, M.A.I., Pelgrom, P.J.M., van der Goot, A.J., Boom, R.M., 2015. Dry fractionation for sustainable production of functional legume protein concentrates. *Trends Food Sci. Technol.* 45, 327–335.
- Schutyser, M.A.I., van der Goot, A.J., 2011. The potential of dry fractionation processes for sustainable plant protein production. *Trends Food Sci. Technol.* 22, 154–164.
- Shahidi, F. (Ed.), 1990. *Canola and Rapeseed*. Springer US, Boston, MA.
- Shahidi, F., Ambigaipalan, P., 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *J. Funct. Foods* 18, 820–897.

- Shi, W., Dumont, M.-J., 2014. Processing and physical properties of canola protein isolate-based films. *Ind. Crops Prod.* 52, 269–277.
- Shin, H.-D., McClendon, S., Le, T., Taylor, F., Chen, R.R., 2006. A complete enzymatic recovery of ferulic acid from corn residues with extracellular enzymes from *Neosartorya spinosa* NRRL185. *Biotechnol. Bioeng.* 95, 1108–1115.
- Siger, A., Czubinski, J., Dwiecki, K., Kachlicki, P., Nogala-Kalucka, M., 2013. Identification and antioxidant activity of sinapic acid derivatives in *Brassica napus* L. seed meal extracts: Main phenolic compounds in rapeseed. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* n/a-n/a.
- Siger, A., Gawrysiak-Witulska, M., Bartkowiak-Broda, I., 2017. Antioxidant (Tocopherol and Canolol) Content in Rapeseed Oil Obtained from Roasted Yellow-Seeded *Brassica napus*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 94, 37–46.
- Singhania, R.R., Patel, A.K., Soccol, C.R., Pandey, A., 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 44, 13–18.
- Sørensen, A.-D.M., Durand, E., Laguerre, M., Bayrasy, C., Lecomte, J., Villeneuve, P., Jacobsen, C., 2014. Antioxidant Properties and Efficacies of Synthesized Alkyl Caffeates, Ferulates, and Coumarates. *J. Agric. Food Chem.* 62, 12553–12562.
- Sørensen, A.-D.M., Lyneborg, K.S., Villeneuve, P., Jacobsen, C., 2015. Alkyl chain length impacts the antioxidative effect of lipophilized ferulic acid in fish oil enriched milk. *J. Funct. Foods* 18, 959–967.
- Sosulski, F., 1979. Organoleptic and nutritional effects of phenolic compounds on oilseed protein products: a review. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56, 711–715.
- Sosulski, F., Youngs, C.G., 1979. Yield and functional properties of air-classified protein and starch fractions from eight legume flours. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56, 292–295.
- Sroka, Z., Cisowski, W., 2003. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem. Toxicol.* 41, 753–758.
- Stalikas, C.D., 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* 30, 3268–3295.

- Szydłowska-Czerniak, A., Amarowicz, R., Szłyk, E., 2010a. Antioxidant capacity of rapeseed meal and rapeseed oils enriched with meal extract. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112, 750–760.
- Szydłowska-Czerniak, A., Bartkowiak-Broda, I., Karlović, I., Karlovits, G., Szłyk, E., 2011. Antioxidant capacity, total phenolics, glucosinolates and colour parameters of rapeseed cultivars. *Food Chem.* 127, 556–563.
- Szydłowska-Czerniak, A., Rabiej, D., Krzemiński, M., 2018. Synthesis of novel octyl sinapate to enhance antioxidant capacity of rapeseed-linseed oil mixture: Octyl sinapate as a new lipophilic antioxidant. *J. Sci. Food Agric.* 98, 1625–1631.
- Szydłowska-Czerniak, A., Trokowski, K., Karlovits, G., Szłyk, E., 2010b. Determination of Antioxidant Capacity, Phenolic Acids, and Fatty Acid Composition of Rapeseed Varieties. *J. Agric. Food Chem.* 58, 7502–7509.
- Szydłowska-Czerniak, A., Tułodziecka, A., 2015. Application of response surface methodology to optimize ultrasound-assisted extraction of total antioxidants from *Brassica napus* cultivars: Ultrasound effect on antioxidants extraction from rapeseed. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 117, 491–502.
- Tabatabaei, S., Vitelli, M., Rajabzadeh, A.R., Legge, R.L., 2017. Analysis of protein enrichment during single- and multi-stage tribo-electrostatic bioseparation processes for dry fractionation of legume flour. *Sep. Purif. Technol.* 176, 48–58.
- Terres Univia, 2016. Qualités des tourteaux – Colza – Tournesol – (2016).
- Terres Univia, 2016. Les espèces cultiées – Cultures & utilisation. <http://www.terresunivia.fr/cultures-utilisation/les-especes-cultivees/colza>
- Terres Univia, 2016. Les espèces cultiées – Cultures & utilisation. <http://www.terresunivia.fr/cultures-utilisation/les-especes-cultivees/colza>
- Tong, J., Ma, B., Ge, L., Mo, Q., Zhou, G., He, J., Wang, Y., 2015. Dicafeoylquinic Acid-Enriched Fraction of *Cichorium glandulosum* Seeds Attenuates Experimental Type 1 Diabetes via Multipathway Protection. *J. Agric. Food Chem.* 63, 10791–10802.
- Tripathi, M.K., As, M., 2017. Prospects and Problems of Dietary Glucosinolates in Animal Feeding. *Adv. Dairy Res.* 05.
- USDA, 2018. Oilseeds : World Markets and Trade

- Vafiadi, C., Topakas, E., Nahmias, V.R., Faulds, C.B., Christakopoulos, P., 2009. Feruloyl esterase-catalysed synthesis of glycerol sinapate using ionic liquids mixtures. *J. Biotechnol.* 139, 124–129.
- van Schijndel, J., Canalle, L.A., Molendijk, D., Meuldijk, J., 2017. The green Knoevenagel condensation: solvent-free condensation of benzaldehydes. *Green Chem. Lett. Rev.* 10, 404–411.
- Verstraete, F., 2010. Management and regulation of certain bioactive compounds present as inherent toxins in plants intended for feed and food. *Bioact. Compd. Plants-Benefits Risks Man Anim.*
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C.N., Romero-Gomez, S. de J., Díaz-Godínez, G., Augur, C., 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem. Eng. J.* 13, 157–167.
- Von Der Haar, D., Müller, K., Bader-Mittermaier, S., Eisner, P., 2014. Rapeseed proteins – Production methods and possible application ranges. *OCL* 21, D104.
- Vuorela, S., Meyer, A.S., Heinonen, M., 2004. Impact of Isolation Method on the Antioxidant Activity of Rapeseed Meal Phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 52, 8202–8207.
- Vuorela, S., Meyer, A.S., Heinonen, M., 2003. Quantitative analysis of the main phenolics in rapeseed meal and oils processed differently using enzymatic hydrolysis and HPLC. *Eur. Food Res. Technol.* 217, 517–523.
- Wang, C., Wu, J., Bernard, G.M., 2014. Preparation and characterization of canola protein isolate–poly(glycidyl methacrylate) conjugates: A bio-based adhesive. *Ind. Crops Prod.* 57, 124–131.
- Wang, J., Zhao, J., de Wit, M., Boom, R.M., Schutyser, M.A.I., 2016. Lupine protein enrichment by milling and electrostatic separation. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 33, 596–602.
- Waraho, T., McClements, D.J., Decker, E.A., 2011. Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. *Trends Food Sci. Technol.* 22, 3–13.
- Weisz, G.M., Kammerer, D.R., Carle, R., 2009. Identification and quantification of phenolic compounds from sunflower (*Helianthus annuus* L.) kernels and shells by HPLC-DAD/ESI-MSn. *Food Chem.* 115, 758–765.

- Wildermuth, S.R., Young, E.E., Were, L.M., 2016. Chlorogenic Acid Oxidation and Its Reaction with Sunflower Proteins to Form Green-Colored Complexes: Chlorogenic acid oxidation.... Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 15, 829–843.
- Yang, S.-C., Arasu, M.V., Chun, J.-H., Jang, Y.-S., Lee, Y.-H., Kim, I.H., Lee, K.-T., Hong, S.-T., Kim, S.-J., 2015. Identification and Determination of Phenolic Compounds in Rapeseed Meals (*Brassica napus* L.). J. Agric. Chem. Environ. 04, 14–23.
- Ye, F., Liang, Q., Li, H., Zhao, G., 2015. Solvent effects on phenolic content, composition, and antioxidant activity of extracts from florets of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Ind. Crops Prod. 76, 574–581.
- Zago, E., Durand, E., Barouh, N., Lecomte, J., Villeneuve, P., Aouf, C., 2015a. Synthesis of Lipophilic Antioxidants by a Lipase-B-Catalyzed Addition of Peracids to the Double Bond of 4-Vinyl-2-methoxyphenol. J. Agric. Food Chem. 63, 9069–9075.
- Zago, E., Lecomte, J., Barouh, N., Aouf, C., Carré, P., Fine, F., Villeneuve, P., 2015b. Influence of rapeseed meal treatments on its total phenolic content and composition in sinapine, sinapic acid and canolol. Ind. Crops Prod. 76, 1061–1070.
- Zhang, H., Mittal, G., 2010. Biodegradable protein-based films from plant resources: A review. Environ. Prog. Sustain. Energy 29, 203–220.
- Zilic, S., Maksimovic-Dragisic, J., Maksimovic, V., Maksimovic, M., Basic, Z., Crevar, M., Stankovic, G., 2010. The content of antioxidants in sunflower seed and kernel. Helia 33, 75–84.